



**Vânia Sofia Ribeiro
Borges**

**Controlo microbiológico de culturas mistas para a
produção de PHA**



**Vânia Sofia Ribeiro
Borges**

**Controlo microbiológico de culturas mistas para a
produção de PHA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela, Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro.

"A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O Homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada."

Albert Einstein

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Helena Gomes de Almeida Gonçalves Nadais

Professora Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Cheng Chia-Yau

Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Prof. Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela

Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro
(Orientadora)

Agradecimentos

É com muita satisfação que expresso o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho para a concretização do meu percurso académico.

Gostaria antes de mais de agradecer à Professora Doutora Isabel Capela, orientadora desta tese, pelo apoio, incentivo e disponibilidade demonstrada em todas as fases que levaram à concretização deste trabalho.

Gostaria ainda de agradecer:

À Professora Luísa Serafim, Departamento de Química, pelo apoio concedido. Ao Flávio Silva pela ajuda prestada, cooperação laboratorial, pelos conhecimentos transmitidos e muitas ideias concedidas.

À Marta Carvalho, pela alegria, boa disposição, ajuda e apoio prestado, tanto a nível técnico como pessoal, ao longo do desenvolvimento experimental desta tese. À Marta Barbosa, pela ajuda e dicas dispensadas no trabalho prático de microbiologia.

Um agradecimento muito especial ao Nuno por tudo. Todo o apoio, ajuda, disponibilidade e ânimo transmitidos, nos bons e maus momentos, que fizeram sem dúvida uma grande diferença na elaboração desta tese.

À Cláudia, pela amizade e ajuda que tornou possível a concretização desta etapa, à Tânia pela amizade, apoio, incentivo e muitas alegrias e angústias partilhadas.

A todos os meus amigos que não vou mencionar, mas que nem por isso são menos especiais para mim, pela amizade, pelo auxílio, pelas brincadeiras e pela sua contribuição directa e/ou indirecta para a elaboração desta tese.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais e irmãos pela confiança, apoio e incentivo ao longo de todo o meu percurso académico. Aos meus cunhados, às minhas sobrinhas e sobrinho pelos momentos de brincadeira, alegria e leveza de espírito transmitidos.

Palavras-chave

Biopolímeros; Polihidroxicanoatos (PHAs); Culturas mistas; Microfauna; Análises biológicas; Armazenamento; Alimentação Dinâmica Aeróbia; Condições operacionais; Controlo de operação

Resumo

O presente trabalho vem em resposta à necessidade de redução de resíduos dispensados para o meio ambiente, nomeadamente os plásticos, assim como a utilização de recursos renováveis em processos industriais. Neste contexto, os polímeros têm-se vindo a tornar um problema grave devido à sua elevada resistência à biodegradação e consequente acumulação no meio, pelo que os biopolímeros representam um potencial para a substituição sustentável de termoplásticos derivados de combustíveis fósseis.

O principal objectivo desta tese foi o desenvolvimento de condições de operação de reactores SBR para a selecção de microrganismos a partir de culturas mistas com elevada capacidade de armazenamento de PHAs. Para alcançar este objectivo foram operados dois reactores descontínuos sequenciais (SBR) inoculados com lamas biológicas. Estes dois reactores operaram com um tempo total de ciclo de 12h, foram submetidos a condições dinâmicas aeróbias e alimentados com substratos orgânicos simples em que as proporções de ácido acético: ácido propiónico foram de 2:1 e 1:1, em massa, para analisar a influência da fonte de carbono na selecção de bactérias acumuladoras de PHAs. Cada um deles foi submetido a cargas crescentes de matéria orgânica (2, 4 e 8gCQO.L⁻¹.d⁻¹) também para análise da influência da carga na obtenção de biopolímeros.

Ao longo do procedimento experimental dos reactores, foi efectuada uma monitorização microbiológica qualitativa das lamas biológicas, para verificar o estado e evolução funcional dos reactores, bem como a acumulação de polímeros. Foi também efectuada a análise de parâmetros físico-químicos para análise da evolução do funcionamento do reactor.

Através da análise microbiológica qualitativa foi possível identificar e prever casos de má sedimentabilidade, *bulking* viscoso e *bulking* filamentoso, podendo desta serem tomadas medidas correctivas adequadas para cada problema.

Os resultados obtidos permitem concluir que o aumento da fracção de ácido acético presente na alimentação favoreceu a acumulação de polímeros bem como o funcionamento do reactor, uma vez que não ocorreram problemas significativos à excepção da última carga. Para os cenários estudados foi para a proporção ácido acético e ácido propiónico, 2:1, que o tempo de degradação da matéria orgânica foi mais rápido, em apenas 1h, indicando que se estariam a seleccionar bactérias acumuladoras de PHAs. Através da análise microbiológica, foi possível confirmar a selecção de bactérias com capacidade de acumulação de PHAs para as condições impostas para este reactor.

Os resultados obtidos através da análise microscópica, para visualização de polímeros, com os testes Negro de Sudão e Azul do Nilo, vieram a demonstrar que o corante Negro de Sudão pode ser utilizado como análise prévia de visualização de polímeros mas a sua existência tem de ser comprovada através da análise do teste Azul do Nilo, devido à sua maior especificidade para corar grânulos de polihidroxialcanoatos (PHAs).

Por análise microscópica, através do teste Azul do Nilo, verificamos que a influência do aumento da carga orgânica se reflectiu no aumento de biopolímeros acumulados para o reactor com maior concentração de ácido acético, ou seja o aumento da carga continuou a favorecer a selecção de bactérias com maior capacidade de armazenamento de PHAs.

Estes resultados indicam que a produção de PHAs por culturas mistas é uma alternativa real à utilização de culturas puras, para produção de biopolímeros. Porém, ainda devem ser alvo de estudo de forma a rentabilizar e tornar viável a produção de biopolímeros a nível industrial, em comparação à produção de polímeros sintéticos.

Keywords

Biopolymers; Polyhydroxyalkanoates (PHAs); Mixed cultures; Microfauna; Storage; Aerobic dynamic feeding (ADF); Operational conditions; Operational control

Abstract

The developed work comes as an answer to the current need of reducing the amount of residues dropped into the environment, namely plastics, as well as to increase the use of renewable resources of industrial processes. Within this context, synthetic plastics are now a major problem due to their high resistance to biodegradation and consequent accumulation, so biological derived polyesters, known as polyhydroxyalkanoate (PHA) represent a potentially sustainable replacement to fossil fuel based thermoplastics.

The main objective of this thesis was the development of the operational conditions of sequencing batch reactors (SBR) for the selection of microorganisms from mixed cultures with high capacity for PHA storage. In order to achieve this objective, two SBR reactors were operated and inoculated with activated sludge. These two reactors operated with a total cycle of 12h, were submitted to dynamic and aerobic conditions, and being fed with simple organic substrates at two different proportions of acetic acid: propionic acid 2:1 and 1:1, in order to analyze the influence of the carbon source in the process of selecting PHA storing bacteria. Each reactor was submitted to increasing loads of organic matter (2, 4 and 8gCQO.L⁻¹.d⁻¹) for evaluation of the load effect on the amount of produced polymers.

Along the experimental procedure of the reactors, it was done a qualitative microbiologic monitoring of the biological sludge in order to verify the reactor performance, as well as the PHA storage. It were also performed the physical and chemical analyzes with the same purpose.

Through the qualitative microbiologic analysis it was possible to identify and predict settling problems, viscous and filamentous bulking, making it possible to take in advance adequate measures for each problem.

The results obtained allowed the conclusion that the increase of the fraction of acetic acid present in the feed benefited the storage of polymers as well as the behaviour of the reactor, since no meaningful problems occurred with the exception of the last load. Considering the studied scenarios it was the proportion of acetic acid: propionic acid, 2:1, where the organic load added was degraded more quickly, taking just one hour, indicating that PHA storage bacteria were being selected. Through the microbiologic analysis, It was possible to confirm the selection of PHA storage bacteria for the imposed condition in this reactor.

The results obtained with microscopic analysis, for visualizing polymers, with Sudan Black and Nile Blue tests demonstrated that the corant Sudan Black can be used as a previous analysis for polymer visualization but its presence must be confirmed through the Nile Blue test, due to it's great specificity for coloring granules of PHA. By microscopic analysis, using Nile Blue test it was verified that the influence of increasing the organic load was reflected also in an increase of accumulated polymers for the reactor with the higher concentration of acetic acid, which means that the increase on the load continued to benefit the selection of bacteria with the higher capacity for PHA store.

This results show that the production of PHA by mixed cultures is a potential alternative to the use of pure cultures for producing biopolymers. However, they still need to be the target of further research in order to increase the efficiency of the process and make viable the production of biopolymers at a industrial level, in comparison to the production of synthetic polymers.

Índice

Capítulo 1	Introdução	1
1.1	Introdução Geral	5
1.2	Objectivos e Metodologia.....	6
Capítulo 2	Polímeros – Revisão Bibliográfica	5
2.1	Polímeros	7
2.1.1	Características e classificação dos polímeros	7
2.1.2	Impacto Ambiental dos polímeros sintéticos	10
2.2	Biopolímeros	13
2.2.1	Vantagens dos Biopolímeros.....	13
2.2.2	Classificação dos Biopolímeros.....	14
Capítulo 3	PHAs – Revisão Bibliográfica	15
3.1	Descoberta dos PHAs.....	17
3.2	Polihidroxialcanoatos	18
3.3	Produção de PHAs	20
3.4	Um processo de três etapas para produção de PHAs	22
3.4.1	1ª etapa – Fermentação Acidogénica	22
3.4.2	2º passo – Selecção de culturas	24
3.4.3	3º passo – Acumulação de PHAs.....	28
3.5	Factores operacionais que influenciam a produção de PHAs	29
3.5.1	Limitação de nutrientes C:N:P	29
3.5.2	Carga orgânica	32
3.5.3	pH	32
3.5.4	Tempo de retenção de sólidos	33
3.5.5	Temperatura	33
3.5.6	Oxigénio Dissolvido	34
Capítulo 4	Microbiologia – Revisão Bibliográfica	35
4.1	Constituição do licor misto	37
4.1.1	Flocos	38
4.1.2	Polímeros extracelulares, SPE	38
4.1.3	Protozoários e Metazoários	39
4.2	Microrganismos produtores de PHAs	42
4.2.1	Ralstonia eutropha.....	43
4.2.2	Alcaligenes latus.....	43
4.2.3	Bactérias do género Pseudomonas	43
4.2.4	Escherichia coli.....	44

4.2.5	Azotobacter sp	44
4.3	Principais problemas em sistemas de lamas activadas	45
4.3.1	Crescimento disperso e “Pin floc”	45
4.3.2	“Blanket rising”	46
4.3.1	<i>bulking</i> viscoso.....	46
4.3.2	Bactérias filamentosas.....	46
4.4	Reactor SBR para selecção de culturas mistas com capacidade de acumulação de PHA 48	
Capítulo 5	Operação dos Reactores	51
5.1	Materiais e Métodos	53
5.1.1	Descrição da montagem experimental	53
5.1.2	Condições de operação dos reactores	54
5.1.3	Monitorização da operação dos reactores	55
5.2	Resultados e discussão da operação dos reactores	60
5.2.1	Evolução temporal dos Sólidos Suspensos	60
5.2.2	Evolução temporal da percentagem de remoção em função da carga orgânica	63
5.2.3	Análise aos AOV's	65
5.2.4	Funcionamento durante os Ciclos	67
5.2.1	Análise comparativa dos reactores.....	72
5.2.2	Análise global.....	76
Capítulo 6	Controlo Microbiológico	77
6.1	Monitorização microbiológica da operação dos reactores.....	79
6.1.1	Amostragem.....	79
6.1.2	Identificação de microrganismos	80
6.1.3	Visualização de material polimérico extracelular.....	86
6.1.4	Identificação de PHAs	86
6.2	Resultados e discussão da monitorização microbiológica da operação dos reactores	88
6.2.1	Análise Microbiológica da operação dos reactores	88
6.2.2	Análise da produção de polímeros	94
6.2.3	Análise global.....	96
Capítulo 7	Conclusão e Considerações Finais	99
Capítulo 9	Referências Bibliográficas	105
Anexos.....		117

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Produção mundial de plásticos 1950-2008. (PLASTICSEUROPE <i>et al.</i> , 2009)	10
Figura 2.2 – Procura, uso e eliminação de resíduos plásticos na Europa (PLASTICSEUROPE <i>et al.</i> , 2009).....	11
Figura 2.3 – Opções de gestão de resíduos de polímeros (Adaptado de SCOTT, 2000).	12
Figura 3.1 – Estrutura dos polihidroxialcanoatos (PHAs). (KHANNA <i>et al.</i> , 2005).....	18
Figura 3.2 – Estrutura do copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), onde R – metilo e R' - etilo.	19
Figura 3.3 – Um processo de três passos para produção de PHAs por culturas mistas utilizando substratos sintéticos (A) ou reais/complexos (B), seguido de uma selecção de culturas utilizando alimentação dinâmica aeróbia (I) ou Anaeróbia/Aeróbia (II) (adaptado de SERAFIM <i>et al.</i> , 2008a).....	22
Figura 3.4 – Processo de degradação da digestão anaeróbia, respectivos produtos e bactérias intervenientes (adaptado de TCHOBANOGLIOUS <i>et al.</i> , 2003).	23
Figura 3.5 - Perfis de concentrações e de velocidade específica de crescimento num processo com culturas mistas submetidas a condições dinâmicas de adição de carbono (SERAFIM <i>et al.</i> , 2000).....	26
Figura 3.6 – Representação da produção de polímeros a partir do acetato, propionato, butirato e valerato (LEMOS <i>et al.</i> , 2006).	27
Figura 4.1 – Rede trófica num sistema de lamas activadas (CANLER <i>et al.</i> , 1999).	37
Figura 4.2 – Representação da estrutura dos flocos de lamas activadas (SEVIOUR <i>et al.</i> , 2010).	38
Figura 5.1 – Representação esquemática da instalação laboratorial.	53
Figura 5.2 – Imagem da instalação laboratorial operada.	53
Figura 5.3 – Esquema de um ciclo de operação dos reactores SBR utilizados neste trabalho experimental.	54
Figura 5.4 – Equipamento utilizado para a determinação dos sólidos: a) estufa; b) mufla.	56
Figura 5.5 – Espectrofotómetro utilizado para determinação da CQO.	58
Figura 5.6 - Cromatógrafo utilizado na análise dos AOV's.	59
Figura 5.7 – Evolução dos SST e SSV durante o tempo de operação para o reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico.	61
Figura 5.8 - Evolução dos SST e SSV durante o tempo de operação para o reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1.....	62
Figura 5.9 – Variação da percentagem de remoção ao longo do tempo de operação e em função da carga orgânica para o reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico.	63
Figura 5.10 - Variação da percentagem de remoção ao longo do tempo de operação e em função da carga orgânica para o reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1.	64

Figura 5.11 – A - Caracterização dos AOV's presentes no reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico. B - Concentração dos AOV's e CQO residual em função da percentagem de ácidos existente em solução na fase de "fome".....	65
Figura 5.12 – A Evolução dos AOV's no decorrer de um ciclo de operação, com carga orgânica de $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1. B Concentração dos AOV's e CQO residual em função da percentagem de ácidos existente em solução na fase de "fome".	66
Figura 5.13 – Evolução da CQO no decorrer do controlo de um ciclo, com carga orgânica de $2\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico.....	67
Figura 5.14 - Evolução da CQO no decorrer do controlo de um ciclo, com carga orgânica de $2\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1.	68
Figura 5.15 – Evolução do pH no decorrer do controlo de um ciclo, com carga orgânica de $2\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 1:1 e 2:1.	68
Figura 5.16 - Evolução da CQO no decorrer de um ciclo de operação, com carga orgânica de $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico.....	69
Figura 5.17 - Evolução dos AOV's no decorrer de um ciclo de operação, com carga orgânica de $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico.....	70
Figura 5.18 - Evolução da CQO no decorrer de um ciclo de operação, com carga orgânica de $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1.	70
Figura 5.19 - Evolução dos AOV's no decorrer de um ciclo de operação, com carga orgânica de $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1.	71
Figura 5.20 - Evolução do pH no decorrer do controlo de um ciclo, com carga orgânica de $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 1:1 e 2:1.	71
Figura 5.21 – Evolução da taxa de crescimento da biomassa para as cargas estudadas.	72
Figura 5.22 - Perfis das taxas específicas de crescimento para ambos os reactores ao longo do tempo.....	73
Figura 6.1 – Microscópio utilizado para a visualização microbiológica das amostras.	79
Figura 6.2 – Ciclo completo do rRNA para análise de comunidades microbióticas (SEVIOUR <i>et al.</i> , 2010).....	81
Figura 6.3 – Análise da espuma existente no reactor HAc:HPr 2:1, dia de operação 13, ampliação de 1000x.	89
Figura 6.4 – Visualização de bactérias filamentosas no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga $2\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, dia de operação 26, ampliação 100x.	89
Figura 6.5 - Teste de SPE no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga $2\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, dia de operação 26, ampliação 100x.	90
Figura 6.6 - Visualização de bactérias filamentosas no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, dia de operação 69, ampliação 100x.	91
Figura 6.7 - Teste de SPE no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, dia de operação 69, ampliação 100x.	91

Figura 6.8 – Visualização de bactérias filamentosas no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga 8 gCQO.L ⁻¹ , dia de operação 82, ampliação 100x.	92
Figura 6.9 – Visualização de bactérias filamentosas no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga 8 gCQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ , dia de operação 98, ampliação 100x.	93
Figura 6.10 – Teste de SPE no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga 8 gCQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ , dia de operação 82, ampliação 100x.	94
Figura 6.11 – Teste de SPE no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga 8 gCQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ , dia de operação 98, ampliação 100x.	94
Figura 6.12 - Grânulos de PHAs com coloração de Negro de Sudão 2h após o início do ciclo para a carga 4g CQO.L ⁻¹ no reactor HAc:HPr 2:1, ampliação 1000x.	95
Figura 6.13 - Grânulos de PHAs com coloração de Azul do Nilo 2h após o início do ciclo para a carga 2 gCQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ no reactor HAc:HPr 2:1 (A e B).	95

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Classificação dos polímeros com base nas suas propriedades mecânicas e térmicas (GNANOU <i>et al.</i> , 2008).....	9
Tabela 2.2 – Poder calorífico dos plásticos comparado com combustível convencional. (REDDY <i>et al.</i> , 2003).....	12
Tabela 3.1 – Degradação de PHAs em vários ambientes (LUZIER, 1992).....	20
Tabela 3.2 - Companhias de produção e pesquisa de PHAs a nível mundial (Chen, 2010).....	21
Tabela 3.3 – Produção de biopolímeros por culturas mistas utilizando diversos substratos orgânicos (adaptado de (DIAS <i>et al.</i> , 2006, JOHNSON <i>et al.</i> , 2009)).	30
Tabela 3.4 - Produção de biopolímeros por culturas mistas utilizando diversos substratos reais complexos (DIONISI <i>et al.</i> , 2005a, SERAFIM <i>et al.</i> , 2008a).....	30
Tabela 4.1 – Quadro síntese da microfauna presente em lamas activadas.	40
Tabela 4.2- Causas e efeitos de problemas microbiológicos verificados em sistemas de lamas activadas (Adaptado de JENKINS <i>et al.</i> , 2004)	45
Tabela 4.3 – Resumo das causas de <i>bulking</i> filamentoso e respectivo tipo de bactéria (JENKINS <i>et al.</i> , 2004).....	47
Tabela 5.1 – Constituintes da alimentação fornecida aos reactores (adaptado de DIONISI <i>et al.</i> , 2004).....	54
Tabela 5.2 – Quadro resumo das condições de operação de reactores estudada ao longo deste trabalho.....	55
Tabela 5.3 – Características de operação do cromatógrafo gás-líquido.	59
Tabela 6.1 – Análise qualitativa da abundância das bactérias filamentosas (JENKINS <i>et al.</i> , 2004).	82
Tabela 6.2 - Microrganismos indicadores das condições de depuração (FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 1997).	84
Tabela 6.3 - Desempenho de estações de tratamento indicadas por grupos dominantes da microfauna (MADONI, 1994).	84
Tabela 6.4 – Microfauna existente em ambos os reactores para as cargas 2gCQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ e 4gCQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	88
Tabela 6.5 - Microfauna existente em ambos os reactores para a carga 8 gCQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	92

Lista de abreviaturas

ADF	- Alimentação Dinâmica Aeróbia
AOV	- Ácidos Orgânicos Voláteis
ATP	- Adenosina Trifosfato
CBO	- Carência Bioquímica de Oxigénio
CQO	- Carência Química de Oxigénio
EBPR	- “Enhanced Biological Phosphorus Removal”
EDTA	- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ETAR	- Estação de Tratamento de Águas Residuais
FISH	- “ <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i> ”
GAO	- Organismos acumuladores de glicogénio
HA	- Hidroxialcanoato
HAc:HPr	- Proporção Ácido Acético versus Ácido Propiónico, em massa
HB	- Hidroxibutirato
HHX	- Hidroxihexanoato
HMB	- Hidroximetilbutirato
HO	- Hidroxi octanoato
HV	- Hidroxivalerato
IBL	- Índice Biótico das Lamas
OD	- Oxigénio Dissolvido
PAO	- Organismos acumuladores de polifosfatos
PHA	- Polihidroxialcanoato
PHMB	- Polihidroximetilbutirato
PHMV	- Polihidroximetilvalerato
PHV	- Polihidroxivalerato
P(3HB)	- Polihidroxibutirato
P(3HB-co-3HV)	- Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
rRNA	- Ácido ribonucleico ribossomal
SBR	- “ <i>Sequencing Batch Reactor</i> ”
SPE	- Substância Polimérica Extra-celular
SS	- Sólidos Suspensos
SST	- Sólidos Suspensos Totais
SSV	- Sólidos Suspensos Voláteis
SVI	- Índice de Volume de Lamas
TCA	- Ácido tricarboxílico
TRH	- Tempo de retenção hidráulico
TRS	- Tempo de retenção de sólidos

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

O rápido crescimento da população humana, combinando as necessidades do seu actual estilo de vida, insta à utilização racional, eficiente e sustentável dos recursos naturais para a produção de materiais amigos do meio ambiente.

A grande dependência dos combustíveis fósseis, especialmente o petróleo, associada à subida de preço dos mesmos, tem tido fortes impactos económicos e consequentemente na própria sociedade. Assim sendo, a sociedade actual tem procurado cada vez mais formas para se tornar independente deste tipo de combustíveis. A procura por soluções renováveis para o desenvolvimento sustentável tem passado por várias áreas, desde o sector energético, com o investimento em fontes de energia renováveis, à construção civil, através da construção de casas ecológicas, passando também pelo sector industrial.

Durante anos foram descobertas e desenvolvidas várias formas de melhorar a nossa qualidade de vida. Uma das quais esteve relacionada com o início da industrialização e a necessidade de distribuir alimentos sem que estes se estragassem ou perdessem qualidade. Foi nesta altura que as propriedades dos plásticos sintéticos, nomeadamente a sua capacidade para retardar e prevenir o ataque por fungos, bactérias e outros organismos vivos a esses materiais, se tornaram fundamentais para iniciar o seu uso no sector das embalagens. Como estes polímeros sintéticos possuem alta resistência química e são mais ou menos elásticos, passaram a ser muito utilizados como matéria-prima em diversos outros sectores, como industrial, electrónico, automóvel, doméstico, saúde, etc.

Contudo estes polímeros sintéticos começaram a tornar-se um problema devido à sua alta resistência à biodegradação, aparecendo no final da sua vida útil como resíduos em grandes quantidades, principalmente enquanto embalagens.

Uma vez que os polímeros sintéticos são um dos materiais mais importantes para a sociedade, é real a preocupação atribuída à utilização dos plásticos convencionais e sua posterior rejeição no meio. A acumulação de plásticos recalcitrantes no ambiente tornou-se actualmente um problema mundial.

Na pesquisa de materiais ecológicos para substituir os plásticos convencionais, têm sido desenvolvidos diferentes plásticos biodegradáveis quer por incorporação de polímeros naturais em plásticos convencionais, por síntese química, ou por fermentação microbiana ou então isolados e extraídos a partir de organismos naturais dos diferentes ecossistemas.

Existem vários tipos de plásticos biodegradáveis, sendo os polihidroxialcanoatos (PHAs) são os únicos 100% biodegradáveis (KHANNA *et al.*, 2005). Possuem propriedades similares a vários termoplásticos sintéticos como o polipropileno, podendo ser utilizados como substitutos destes e utilizam uma fonte renovável de carbono para o seu fabrico.

Os PHAs são poliésteres de hidroxialcanoatos sintetizados pelas bactérias como fonte de carbono e energia. A biossíntese e acumulação deste biopolímero ocorre na maioria das bactérias se a fonte de carbono for fornecida em excesso e outro nutriente como N, P, S, O ou Mg, for limitante. Os microrganismos produtores de PHAs são geralmente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas das quais fazem parte a *Ralstonia eutropha*,

Protomonas extorquens, *Protomonas oleovorans*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, e *Escherichia coli* recombinante.

Apesar de já existir produção industrial deste tipo de polímeros a partir de culturas puras, o seu preço é mais elevado do que o dos polímeros sintéticos, sendo ainda encarado como um polímero pouco atractivo do ponto de vista comercial. Alguns dos caminhos apontados para diminuição dos custos de produção passa pelo aumento da eficácia de extracção dos polímeros das células e pelo rendimento e custo do substrato (LEE, 1996b).

Outra forma de otimizar a produção de PHAs de uma forma rentável é a utilização de culturas mistas, em vez de culturas puras. A produção de PHAs envolvendo culturas mistas compreende dois ou três passos: a fermentação acidogénica em anaerobiose da fonte de carbono para obtenção de ácidos orgânicos voláteis (AOV's) e ácidos lácticos; a selecção de culturas com elevada capacidade de acumulação de PHAs utilizando o substrato produzido no primeiro passo; e a optimização da produção de PHAs utilizando as culturas seleccionadas no segundo passo.

Este trabalho baseia-se no controlo microbiológico de dois reactores sob condições de alimentação dinâmica aeróbia, de forma a seleccionar uma população de microrganismos com elevada capacidade de acumulação de PHAs, utilizando ácidos orgânicos voláteis como fonte de carbono.

1.2 OBJECTIVOS E METODOLOGIA

O trabalho apresentado constitui a dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente e tem como objectivo geral o desenvolvimento de um processo biológico para a obtenção de um enriquecimento microbiológico de culturas mistas em que os microrganismos possuam elevada capacidade de acumulação de PHAs.

Os resultados obtidos neste estudo poderão contribuir para o avanço dos estudos de produção de polímeros recorrendo a culturas mistas. Para este efeito foi necessário:

1. Identificar e caracterizar os factores operacionais a serem controlados para a operação dos reactores;
2. Identificar e caracterizar os métodos a serem utilizados para efectuar o controlo físico, químico e microbiológico;
3. Analisar e avaliar a forma como os reactores respondem às variações dos vários parâmetros através de análises físico-químicas;
4. Averiguar a forma como os microrganismos respondem à variação dos factores operacionais impostos;
5. Identificar quais as melhores condições de operação a nível físico-químico e microbiológico para a acumulação de PHAs.

CAPÍTULO 2

POLÍMEROS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLÍMEROS

O termo polímero¹ é bastante antigo e tem sido usado desde 1866, altura em que Berthelot o aplicou à obtenção de um poliestireno gelatinoso (GNANOU *et al.*, 2008).

O primeiro polímero sintético, polímero de fenol-formaldeído, a que foi dado o nome de “baquelite”, em 1909 por Leo Baekeland, foi inicialmente usado para fabricar bolas de bilhar. Rayon, a primeira fibra sintética, foi desenvolvida para substituição da seda em 1911 (KATZ, 1998).

Contudo o conceito de cadeia polimérica como a conhecemos actualmente teve de esperar pelo trabalho de Staudinger (Prémio Nobel, 1953) antes de ser totalmente aceite. Só a partir dessa altura, aproximadamente em 1920, é que a teoria macromolecular se sobrepôs à teoria micelar (GNANOU *et al.*, 2008).

Desde 1920, que a ciência dos materiais poliméricos tem avançado a um ritmo elevado. Evoluções significativas têm sido efectuadas na síntese e aplicação de materiais poliméricos, tendo sido atribuído o prémio Nobel 5 vezes a cientistas poliméricos (Staudinger em 1953, Ziegler e Natta em 1963, Flory em 1974, De Gennes em 1991, e recentemente McDiarmid, Shirakawa e Heeger em 2000) (GNANOU *et al.*, 2008).

2.1.1 CARACTERÍSTICAS E CLASSIFICAÇÃO DOS POLÍMEROS

Os polímeros, vulgarmente conhecidos como plásticos, são um dos materiais mais importantes para a sociedade contemporânea (GNANOU *et al.*, 2008). São diversos os sectores que utilizam polímeros como matéria-prima desde os mais complexos como electrónica, informática, indústria automóvel e saúde, à construção civil, fabrico de material doméstico, entre outros. Os polímeros estão presentes na quase totalidade dos utensílios que utilizamos quotidianamente (B.C.COUTINHO *et al.*, 2004, ROSA *et al.*, 2001, SANTOS *et al.*, 2004).

Uma das vantagens dos plásticos é que a sua estrutura química pode ser manipulada contendo assim uma ampla gama de resistência e forma. Materiais como o polipropileno (PP), o polietileno sintético (PE), policloroeteno (PVC), poliamida (Nylon) e poliestireno (PS) são amplamente utilizados na produção de plásticos podendo estes ser facilmente moldados em quase qualquer forma desejada, incluindo fibras e filmes finos. Como possuem alta resistência química e são mais ou menos elásticos, são muito utilizados em diversos bens e em materiais de embalagem (PRADELLA, 2006, REDDY *et al.*, 2003, SANTOS *et al.*, 2004).

Ao contrário dos polímeros naturais, como o amido, a celulose, as proteínas, entre outros, o que tornou os polímeros sintéticos tão cativantes foi a sua relativa inércia e resistência à biodegradação. A investigação tomou assim os primeiros passos com a finalidade de retardar e prevenir o ataque por fungos, bactérias e outros organismos vivos a esses materiais. Um tipo de polímero, os hidrocarbonetos, é de tal forma resistente ao ataque

¹ Polímero - do grego “polis” que significa muitas e “meros” que significa partes (Katz)

químico e biológico que lhes assegura a manutenção das suas características por um período de tempo bastante alargado, garantindo a sua longevidade (ROSA *et al.*, 2002).

Actualmente um polímero é definido como um sistema formado por entidades moleculares de grandes dimensões, que são obtidas por ligações covalentes de um grande número de unidades repetidas, designadas por monómeros.

Os polímeros sintéticos são obtidos através da reacção conhecida como reacção de polimerização que transforma monómeros em várias ligações covalentes de monómeros ou polímeros. É designado de copolímero, quando um polímero é obtido a partir da polimerização de diferentes moléculas de monómeros exibindo diferente estrutura molecular (GNANOU *et al.*, 2008).

Os polímeros podem ser classificados de diversas formas:

- Pela sua origem – podem ser classificados em 3 categorias, segundo Gnanou&Fontanille, polímeros naturais, artificiais (semi-sintéticos) e sintéticos, estando descritos abaixo;
- Quanto à natureza química – classificados de acordo com o mecanismo de reacção envolvido na polimerização, dividindo as reacções características em cadeia e em etapas, correspondendo, respectivamente, às poliadições e policondensações (SANTOS *et al.*, 2004);
- Quanto à estereoquímica – classificados de acordo com a orientação na cadeia dos resíduos orgânicos, designando-se isotáticos aos que têm todos os resíduos orgânicos orientados para o mesmo lado da cadeia, sindiotáticos aos que possuem os grupos alternados regularmente de ambos os lados da cadeia e atáticos aos que possuem os resíduos orgânicos orientados ao acaso (SANTOS *et al.*, 2004);
- Morfologia – no estado sólido há 2 tipos de morfologia: o amorfo e o semi-cristalino (SANTOS *et al.*, 2004);
- Tipo de aplicação – definidos quanto à sua utilidade, de uso geral (polímeros utilizados nas mais variadas aplicações, como o polietileno, o polipropileno, o poliestireno, baquelite, etc.), ou plásticos de engenharia (o poliacetal, o policarbonato e o politetrafluoretileno, utilizados em substituição de materiais usados em engenharia) (SANTOS *et al.*, 2004);
- Comportamento mecânico, etc.

Dependendo da sua origem os polímeros podem ser classificados em 3 categorias (GNANOU *et al.*, 2008):

- Polímeros naturais – obtidos a partir de fontes naturais ou animais. A esta categoria pertencem todas as famílias de polissacarídeos (celulose, amido, etc.), proteínas (lã, seda, etc.), borracha natural, etc.

- Polímeros artificiais (semi-sintéticos) – são obtidos por alterações químicas dos polímeros naturais com objectivo de modificar algumas das suas propriedades, alguns deles como esteres de celulose (nitrocelulose, acetato de celulose, etc.) foram economicamente importantes durante muito tempo.
- Polímeros sintéticos – são exclusivamente resultado da criação humana (Nylon, PVC, polietileno, entre outros).

Porém, o método mais usual de agrupar os polímeros é em termos do seu comportamento mecânico e térmico. De acordo com esta classificação, as principais categorias de polímeros são os termoplásticos, os termorrígidos e os elastómeros Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Classificação dos polímeros com base nas suas propriedades mecânicas e térmicas (GNANOU *et al.*, 2008).

Termoplásticos		Termorrígidos	
Polietileno	PE	Poliuretanos	PUR
Polietileno de baixa densidade	PEBD	Resina epoxídica	EP
Polietileno de alta densidade	PEAD	Resina de fenol formaldeído	PF
Polietileno reticulado	PER/PEX	Resina de ureia formaldeído	UF
Polipropileno	PP	Resina de melamina formaldeído	MF
Policloreto de vinilo	PVC	Poliéster insaturado	UP
Poliacetato de vinilo	PVAC	Silicone	SI
Poliestireno	PS	Elastómeros	
Polimetacrilato de metilo	PMMA	Silicone	SI
Policarbonato	PC	Poliestireno butadieno	SB
Poliamida	PA	Poliestireno acrilonitrilo	SAN
Polibutileno (Polibuteno)	PB	Acrilonitrilo butadieno estireno	ABS
Polioxifenileno	PPO	Polibutadieno	PBD
Politereftalato de butileno	PBTB	Poliisobutileno	PIB
Politereftalato de etileno	PETB	Policloro (ou Neopreno)	-
Polioxirnetileno	POM	Poliisopreno	PIP
Politetrafluoretileno	PETB		
Politriclorofluoretileno	PTC		

De notar que os termoplásticos e os termorrígidos pertencem ao grupo de polímeros vulgarmente designado por plásticos e os elastómeros ou borrachas a outro grupo de polímeros.

Os termoplásticos compõem o maior número de polímeros comerciais. A principal característica desses polímeros é sua capacidade de serem derretidos várias vezes. Possuem ligações químicas fracas entre as cadeias que podem ser facilmente quebradas com a introdução de energia. A capacidade das cadeias de fluir com a aplicação de calor garante a estes materiais características fundamentais para serem facilmente reprocessáveis. No entanto, quando arrefecidos, voltam a sua rigidez inicial.

Outro aspecto importante é que eles podem ser reciclados a partir de desperdícios e resíduos, uma vez que são facilmente remodelados através da aplicação combinada de pressão e temperatura.

Os termorrígidos são aqueles que uma vez moldados não podem ser derretidos e remoldados novamente. Eles são mecanicamente rígidos, frágeis e estáveis às variações de temperatura. O aquecimento do polímero acabado a altas temperaturas promove decomposição do material antes de ele se funda, complicando assim a sua reciclagem.

Por último, os elastómeros são a classe intermédia entre os termoplásticos e os termorrígidos, não são fundíveis, mas apresentam alta elasticidade.

2.1.2 IMPACTO AMBIENTAL DOS POLÍMEROS SINTÉTICOS

Na década de 1970, tornou-se evidente que as vantagens técnicas que fizeram os polímeros tão úteis eram afinal desvantagens quando os produtos à base de polímeros eram rejeitados no final da sua vida útil, permanecendo por vários anos como detritos no meio ambiente (REDDY *et al.*, 2003).

Ao longo dos anos, o uso do plástico aumentou drasticamente o problema da eliminação dos resíduos sólidos. Desde 1950, tem havido um aumento médio da produção e consumo de plásticos de 9%. De 1,5 milhões de toneladas em 1950, a produção total global atingiu 245 milhões de toneladas em 2008 (ver Figura 2.1). Este aumento contínuo teve um reverso em 2008 como causa directa da crise financeira global que afectou virtualmente todos os sectores (PLASTICSEUROPE *et al.*, 2009).

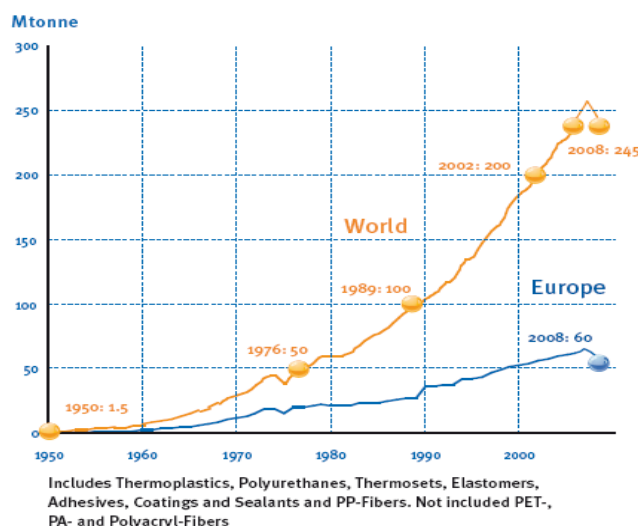


Figura 2.1 – Produção mundial de plásticos 1950-2008. (PLASTICSEUROPE *et al.*, 2009)

Devido às características hidrofóbicas e biologicamente inertes dos polímeros termoplásticos, a sua utilização tornou-se indispensável na embalagem e distribuição de géneros alimentícios. A embalagem de alimentos tornou-se assim um foco central nos

esforços de redução de resíduos. Em termos de uso, na União Europeia, as embalagens representam 38% da procura total de plástico (Figura 2.2).

De todos os plásticos utilizados pelos consumidores, 24,9 milhões de toneladas acabaram como resíduos pós-consumo, acima dos 24,6 milhões de toneladas verificados em 2006. Cerca de 51,3% do plástico pós-consumo utilizado foi recuperado e a outra metade foi para eliminação (Figura 2.2). Dos 51,3% recuperados, 5,3 milhões de toneladas foram reciclados como matéria-prima e 7,5 milhões de toneladas foram recuperadas como energia (PLASTICSEUROPE *et al.*, 2009).

A taxa total de reciclagem de materiais plásticos pós-consumo em 2008 foi de 21,3%. A reciclagem mecânica estava em 21% (até 0,9 pontos percentuais em 2007) e reciclagem de matéria-prima de 0,3% (inalterado em 2007). A taxa de recuperação de energia aumentou 29,2 - 30%. Em 2008, 12,1 milhões de toneladas de resíduos de plástico ainda eram desperdiçados em aterros (PLASTICSEUROPE *et al.*, 2009).

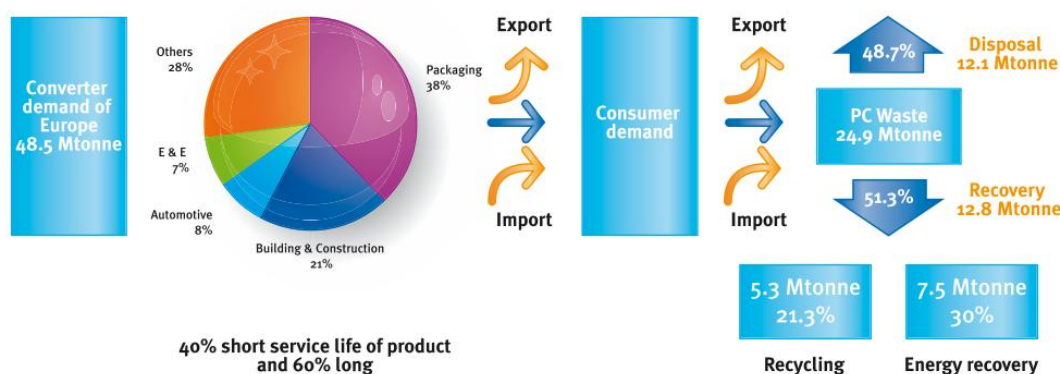


Figura 2.2 – Procura, uso e eliminação de resíduos plásticos na Europa (PLASTICSEUROPE *et al.*, 2009).

Em Portugal, relativamente aos resíduos de embalagens de plástico, e para os anos de 2006 e 2007, foi registada uma taxa de reciclagem da ordem dos 15%. Portugal estabeleceu uma meta para os resíduos de embalagem de plástico de 22,5% até 2011, sendo que estes são, segundo os dados de 2007, os únicos resíduos de reciclagem que não se encontram dentro das metas propostas (AMBIENTE, 2009).

Na prática, uma proporção (em peso) relativamente pequena de materiais poliméricos acaba como lixo. A Figura 2.3 apresenta os procedimentos preferenciais como alternativa de gestão de resíduos para substituir o aterro prevendo-se que os aumentos das taxas de aterro juntamente com os custos de logística de transporte dos resíduos urbanos para zonas rurais irão implicar a eliminação progressiva desta opção de eliminação até o ano de 2015 (SCOTT, 2000).

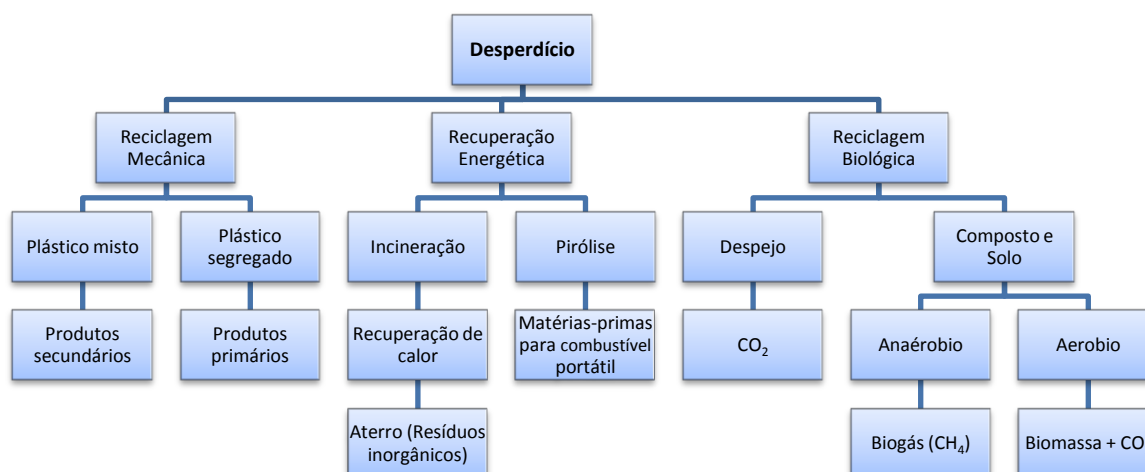


Figura 2.3 – Opções de gestão de resíduos de polímeros (Adaptado de SCOTT, 2000).

Podemos dizer que o que torna o plástico indesejável é a dificuldade de eliminação. Os plásticos sendo xenobióticos² são resistentes à degradação microbiana. O tamanho molecular excessivo parece ser o principal responsável pela resistência destes produtos químicos à biodegradação e pela sua persistência no solo por um período de tempo alargado (REDDY *et al.*, 2003).

Das opções alternativas de gestão de resíduos, a incineração com recuperação de energia é, à primeira vista, uma forma ecologicamente aceitável de reutilizar resíduos de polímeros, devido ao seu elevado poder calorífico (Tabela 2.2). No entanto, além de ser uma opção cara, existe uma desconfiança generalizada da incineração, pelo público em geral, devido à possibilidade de emissões produtos químicos nocivos, como o cloreto de hidrogénio e cianeto de hidrogénio (REDDY *et al.*, 2003).

Tabela 2.2 – Poder calorífico dos plásticos comparado com combustível convencional. (REDDY *et al.*, 2003)

Combustível	Poder Calorífico (MJ/kg)
Metano	53
Gasolina	46
Fuelóleo	43
Carvão	30
Polietileno	~43
Plástico misto	30-40
Resíduo sólido municipal	~10

Uma alternativa à incineração directa, é converter resíduos de polímeros por pirólise ou por hidrogenação de hidrocarbonetos de baixo peso molecular para usar como combustível portátil ou como matérias-primas petroquímicas e em casos específicos,

² Xenobióticos - compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico

monómeros. Mas, de cada vez que os polímeros são reprocessados há uma perda nas propriedades físicas e mecânicas, devido à peroxidação (SCOTT, 2000).

Se os resíduos de polímeros sintéticos têm como objectivo a reciclagem biológica, então eles devem ser, em última instância biodegradáveis em composto. A geração actual de polímeros de embalagem não é biodegradável dentro de um prazo realista, devido à presença de anti-oxidantes, o que levou a uma investigação intensiva, tanto na indústria como nas universidades para desenvolver materiais poliméricos que atendem aos requisitos do usuário, mas que também retornem ao ciclo biológico após o uso (SCOTT, 2000).

2.2 BIOPOLÍMEROS

Na pesquisa de materiais ecológicos para substituir os plásticos convencionais, têm sido desenvolvidos diferentes plásticos biodegradáveis quer por incorporação de polímeros naturais em plásticos convencionais, por síntese química, ou por fermentação microbiana ou então isolados e extraídos a partir de organismos naturais dos diferentes ecossistemas.

Os biopolímeros são materiais poliméricos classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas. A matéria-prima para o seu fabrico é uma fonte de carbono renovável. Segundo estabelecido pela American Standard for Testing and Methods, polímeros biodegradáveis são polímeros degradáveis nos quais a degradação resulta primariamente da acção de microrganismos tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural.

Existem diversos plásticos biodegradáveis disponíveis no mercado tais como os polihidroxialcanoatos (PHAs), que são poliésteres de ácidos hidroxialcanoicos ou hidroxialcenóicos, os polilactato (PLA), poliéster produzido por síntese química a partir de ácido láctico obtido por fermentação bacteriana de glicose, e os poliglicolatos (PGA) (SERAFIM *et al.*, 2000).

2.2.1 VANTAGENS DOS BIOPOLÍMEROS

Como vimos anteriormente uns dos maiores desafios ambientais da actualidade é o desaparecimento dos recursos não renováveis e a gestão dos resíduos urbanos, factores directamente ligados ao sector de embalagens, apontado como um dos principais agentes causadores desses resíduos.

Devido à sua baixa densidade, os plásticos ocupam uma grande fracção em termos de volume nos aterros municipais ($0,9 \text{ g.cm}^{-3}$). A substituição de plásticos sintéticos por plásticos biodegradáveis, pode reduzir quase 20% do total de resíduos em volume e 10% em peso (DIAS *et al.*, 2006).

A ordem de grandeza da degradação dos bioplásticos é de meses (6 a 12 meses) contra 40 a 50 anos ou até 200 anos no caso dos polímeros sintéticos. Os plásticos

biodegradáveis ainda têm uma participação mínima no mercado internacional (cerca de 1%), dominado pelos de origem petroquímica. (B.C.COUTINHO *et al.*, 2004).

2.2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

Os plásticos biodegradáveis podem ser divididos em três categorias (KHANNA *et al.*, 2005):

1. Os polímeros de síntese química: Estes são susceptíveis ao ataque microbiano ou enzimático. Uma vez que não possuem todas as propriedades dos plásticos, não são comercialmente viáveis, como substitutos para o plástico. Como exemplos temos o ácido poliglicólico, ácido polilático, poli(ϵ -caprolactona), álcool polivinílico, poli(óxido de etileno);
2. Plásticos biodegradáveis à base de amido: Neste tipo, o amido é adicionado como enchimento e agente de ligação para produzir uma mistura de amido e de plástico (por exemplo, o amido de polietileno). Os microrganismos do solo degradam o amido facilmente, rompendo com a matriz polimérica. Isto resulta em redução significativa do tempo de degradação. Porém estes plásticos, são apenas parcialmente degradáveis. Os fragmentos deixados após a remoção do amido são recalcitrantes e permanecem no ambiente por muito tempo;
3. Polihidroxicanoatos (PHAs): Estes são os únicos 100% biodegradáveis. São poliésteres de vários hidroxicanoatos e são sintetizados por inúmeros microrganismos como material de reserva energética. Possuem propriedades similares a vários termoplásticos sintéticos como o polipropileno e podem ser utilizados como substitutos destes. São também completamente degradáveis em água e dióxido de carbono sob condições aeróbias e em metano sob condições anaeróbias por microrganismos existentes no solo, oceano, lagos e águas residuais.

CAPÍTULO 3

PHAs – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DESCOBERTA DOS PHAS

No início do século passado, foi observado na bactéria *Azotobacter chroococcum* a presença de inclusões. A composição química de inclusões semelhantes em *Bacillus megaterium* foram mais tarde identificadas como poli(3-hidroxibutirato), P(3HB), por Lemoigne. Até o final da década de 1950 já haviam bastante evidências reunidas para sugerir que P(3HB) funcionava como uma reserva intracelular de carbono e energia nestas bactérias. Na verdade, foi também demonstrado que a ocorrência deste polímero de reserva era um fenómeno generalizado em bactérias Gram-negativas (OJUMU *et al.*, 2004, SUDESH *et al.*, 2000).

Em 1974, Wallen e Rohwedder referiram a identificação em lamas activadas de outros hidroxialcanoatos (HA), que não P(3HB), nomeadamente o 3-hidroxicaproato (3HV) e 3-hidroxiheptanoato (3HHx) como maior e menor constituintes, respectivamente (WALLEN *et al.*, 1974).

Cerca de uma década depois, foi revelada a presença de 3HB e 3HV como os elementos predominantes entre 11 outras unidades de HA. Por volta da mesma época (1983), foi efectuada uma descoberta interessante por Witholt e seus colegas de trabalho, quando cultivavam *Pseudomonas oleovorans* em n-octano (DE SMET *et al.*, 1983). A análise elementar do polímero de armazenamento acumulado por esta bactéria mostrou que consistia principalmente em unidades de 3-Hidroxiocaproato (3HO) e pequenas quantidades de unidades de 3HHx (LAGEVEEN *et al.*, 1988).

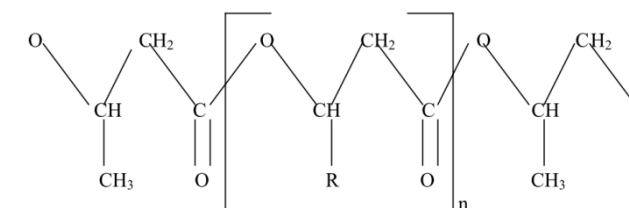
A segunda fase da pesquisa de PHAs deu-se quando se identificou que a incorporação de uma segunda unidade monomérica em P(3HB) podia aumentar significativamente as suas propriedades úteis. Isto levou a um aumento da pesquisa e interesse comercial para este polímero de reserva bacteriano. Foi nesta fase que ocorreu a primeira produção industrial de um copolímero consistindo de 3HB e 3HV (SUDESH *et al.*, 2000).

Nesta etapa (1980), a tendência da investigação foi para identificar e caracterizar todas as várias unidades de HA levando à descoberta de numerosos componentes, incluindo 4HA e 5HA até o final da década de 1980. Por esta altura já era claro que estes polímeros de armazenamento são sintetizados não apenas em bactérias Gram-negativas, mas também em uma grande variedade de bactérias gram-positivas, aeróbias (cianobactérias) e bactérias anaeróbias fotossintéticas (bactérias púrpura com e sem enxofre), bem como em algumas arqueobactérias (SUDESH *et al.*, 2000).

Porém a produção generalizada de PHAs está limitada devido ao elevado custo de produção quando comparado ao plástico sintético. Contudo reduzir o custo do substrato de carbono (por exemplo, através da alimentação com resíduos renováveis) e aumentar a eficiência das tecnologias de produção (incluindo a fermentação, extração e recuperação) são dois exemplos de tentativas de redução de custos de produção de polímeros.

3.2 POLIHIDROXIALCANOATOS

Os PHAs são poliésteres de hidroxialcanoatos sintetizados pelas bactérias como fonte de carbono e energia. A produção dos PHAs é efectuada quando um dos nutrientes, como o N, P, S, O ou Mg, é limitante na presença de excesso de carbono. Quando o nutriente limitante é dado à célula, os compostos de armazenamento de energia são acumulados e só são utilizados pelas células quando uma nova fase de “fome” for instalada (KHANNA *et al.*, 2005, LEE *et al.*, 1999). Na Figura 3.1 encontra-se a fórmula de estrutura geral dos polihidroxialcanoatos.



n varia de 600 a 35000

R – hidrogénio	Poli(3-hidroxipropionato)
R – metilo	Poli(3-hidroxibutirato)
R – etilo	Poli(3-hidroxivalerato)
R – propilo	Poli(3-hidroxihexanoato)
R – pentilo	Poli(3-hidroxioctanoato)
R – nonilo	Poli(3-hidroxibutirato)

Figura 3.1 – Estrutura dos polihidroxialcanoatos (PHAs). (KHANNA *et al.*, 2005)

São conhecidos mais de 100 monómeros como constituintes dos PHAs em várias bactérias (SERAFIM *et al.*, 2000). A maioria destes correspondem a poliésteres alifáticos de carbono, oxigénio e hidrogénio. O grau de polimerização, a variação da posição do radical R e do grupo hidroxilo (n) determinam a identidade da unidade monomérica (LEE, 1996b).

Os PHAs podem ser divididos em duas classes, dependendo do número de carbonos dos monómeros: monómeros de cadeia curta (*short chain length* HAs), PHA_{SCL}, com três a cinco átomos de carbono por monómero na sua cadeia principal, e monómeros de cadeia média (*medium chain length* HAs), PHA_{MCL}, com seis a quinze átomos de carbono por monómero da sua cadeia principal (KNOLL *et al.*, 2009).

O polihidroxibutirato (PHB), foi o primeiro PHA a ser descoberto e é também o PHA mais amplamente estudado e melhor caracterizado. É acumulado como inclusões com diâmetro típico de 0,2 a 0,5 µm localizados no citoplasma das células de muitas bactérias chegando a ultrapassar 80% da massa celular seca (OJUMU *et al.*, 2004, SERAFIM *et al.*, 2000). É altamente cristalino, rígido e frágil, com temperatura de transição vítrea³ e ponto de fusão de cerca de 5 e 175°C, respectivamente (VILLANO *et al.*, 2010). Possui

³ temperatura de transição vítrea – ponto intermédio de temperatura que separa o comportamento sólido do comportamento líquido em um sólido amorfo.

propriedades mecânicas muito similares aos plásticos convencionais, como o polipropileno ou polietileno e pode ser moldado, transformado em fibras, feito em filmes e usado para fazer heteropolímeros com outros polímeros sintéticos (KHANNA *et al.*, 2005, SUDESH *et al.*, 2000).

O copolímero constituído por monómeros de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxivalerato, P(3HB-co-3HV), Figura 3.2, tem melhores propriedades físicas e térmicas, que dependem do conteúdo da unidade hidroxivalerato (HV). A temperatura de fusão diminui significativamente com o aumento da fracção de HV, mas sem afectar a temperatura de degradação, fornecendo assim um polímero com propriedades estruturais similares às do polipropileno. As unidades de HV em cadeias poliméricas aumentam a elasticidade, flexibilidade, diminuindo a permeabilidade à água, a temperatura de transição vítrea e cristalinidade, sendo esta última de 60-80% para o PHB decrescendo para 30-40% para o copolímero com 30% em unidades HV (SERAFIM *et al.*, 2000, VILLANO *et al.*, 2010).

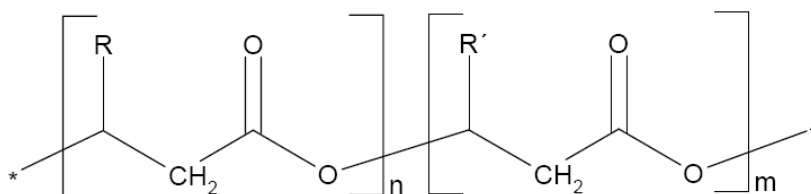


Figura 3.2 – Estrutura do copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), onde R – metilo e R' - etilo.

Outros PHAs acumulados incluem polihidroxivalerato (PHV), polihidroximetilvalerato (PHMV) e o polihidroximetilbutirato (PHMB) (SERAFIM *et al.*, 2000).

Os PHAs têm sido considerados plásticos biocompatíveis para uma ampla gama de uso. As principais áreas da sua aplicação são: embalagem (filmes, sacos, garrafas, contentores), material descartável de higiene pessoal (lâminas de barbear, fraldas, produtos de higiene feminina), e medicina (substitutos ósseos, substituição dos vasos sanguíneos, estimulação do crescimento ósseo). A sua biocompatibilidade e degradação hidrolítica lenta leva ao aumento do seu potencial uso em cirurgia reconstrutiva, segundo S. Y. Lee (1996), o produto da degradação do PHB, D(-)-3-hidroxibutirato, tem sido detectado em grandes quantidades em plasma de sangue humano (LEE, 1996a, OJUMU *et al.*, 2004).

A biodegradação em vários ambientes é sem dúvida a propriedade que destaca os PHAs e o seu interesse comercial e ambiental. Os PHAs são degradados em sistemas biológicos tanto aeróbios quanto anaeróbios pela acção de enzimas extra-celulares segregadas pelos microrganismos, fungos e bactérias, como: *Pseudomonas lemoignei*, *Alcaligenes faecalis*, *Schlegella*, *Thermodepolymerans*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium acetobutylicum* (ABOU-ZEID *et al.*, 2001, JENDROSSEK *et al.*, 1995, KITA *et al.*, 1997, ROMEN *et al.*, 2004).

Em ambiente aeróbio, os produtos finais são dióxido de carbono, água e húmus, em ambiente anaeróbio além destes produtos também é produzido metano. A velocidade de degradação de PHAs depende de muitos factores tais como, temperatura, nível de

mistura, pH e presença de nutrientes (CARMINATTI *et al.*, 2006, LUZIER, 1992, SUDESH *et al.*, 2000). A Tabela 3.1 apresenta a perda de massa dos PHAs em diferentes ambientes.

Tabela 3.1 – Degradação de PHAs em vários ambientes (LUZIER, 1992).

Ambiente	Perda de 100% em massa (semanas)
Ambiente anaeróbio	6
Sedimentos de estuários	40
Ambiente aeróbio	60
Solo	75
Água do mar	350

O principal obstáculo a uma maior difusão comercial de PHAs é actualmente o seu custo, mais elevado em comparação com os plásticos sintéticos (VILLANO *et al.*, 2010).

3.3 PRODUÇÃO DE PHAS

A escolha do substrato é muito importante para a produção dos PHAs tanto em termos de produtividade volumétrica elevada para se poder tornar um produto economicamente competitivo, como em termos do preço do substrato utilizado. Actualmente os custos de produção dependem principalmente do preço do substrato, rendimento do substrato e eficiência de extracção dos polímeros das células (LEE, 1996b).

Apesar da diversidade de PHAs existente, somente quatro deles é que são produzidos em larga escala para exploração comercial. Estes são o PHB, P(3HB-co-3HV), poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato, P(3HB-co-4HB), e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxixanoato), P(HB-co-HHx). A tecnologia predominante para a produção de PHAs utiliza o uso de culturas puras de bactérias aproveitando um substrato puro concentrado. Globalmente existem 24 empresas, Tabela 3.2, que apostam na produção ou investigação, tendo algumas delas parado a sua actividade por volta dos anos 90s, devido ao preço do petróleo. Desde 2003, com o aumento do preço do petróleo para mais de 100\$US por barril que os PHAs experienciaram uma nova vaga de investimento (CHEN, 2010).

Embora seja actualmente produzido comercialmente, o bioplástico é mais caro do que os polímeros sintéticos (9€/kg de PHAs vs. 1€/kg de plástico sintético) e, portanto, ainda é maioritariamente considerado como um polímero pouco atractivo industrialmente (SERAFIG *et al.*, 2004). Abriu-se, desta forma, espaço a um conjunto de estudos com vista à optimização económica da produção destes polímeros biodegradáveis.

A possibilidade de utilizar uma vasta gama de substratos mais baratos incluindo resíduos industriais e de agricultura, segundo Meesters, 1998, pode fazer com que o preço dos PHAs possa ser reduzido até 4€/kg (DIONISI *et al.*, 2005b, MEESTERS, 1998, SERAFIM *et al.*, 2004).

Tabela 3.2 - Companhias de produção e pesquisa de PHAs a nível mundial (Chen, 2010).

Empresa	Tipo de PHA	Escala de produção (ton/ano)	Período	Aplicações
ICI, UK	PHBV	300	1980-1990	Embalagens
Chemie Linz, Austria	PHB	20-100	1980s	Embalagens e pacotes de medicamentos
BTF, Austria	PHB	20-100	1990s	Embalagens e pacotes de medicamentos
Biomers, Germany	PHB	Desconhecida	1990s - Presente	Embalagens e pacotes de medicamentos
BASF, Germany	PHB, PHBV	Experimental	1980-2005	Fusão com a Ecoflex
Metabolix, USA	Vários PHAs	Desconhecida	1980-Presente	Embalagens
Tepha, USA	Vários PHAs	Implantes médicos	1990-Presente	Bio-implantes
ADM, USA (with Metabolix)	Vários PHAs	50,000	2005-Presente	Matéria-prima
P&G, USA	Vários PHAs	Contrato industrial	1980-2005	Embalagens
Monsanto, USA	PHB, PHBV	Projecto prod. PHA	1990s	Matéria-prima
Meredian, USA	Vários PHAs	10,000	2007-Presente	Matéria-prima
Kaneka, Japan (with P&G)	Vários PHAs	Desconhecida	1990-Presente	Embalagens
Mitsubishi, Japan	PHB	10	1990s	Embalagens
Biocycles, Brazil	PHB	100	1990-Presente	Matéria-prima
Bio-On, Italy	PHA (incerto)	10,000	2008-Presente	Matéria-prima
Zhejiang Tun An, China	PHBV	2,000	1990-Presente	Matéria-prima
Jiangmen Biotech Center, China	PHBHHx	Desconhecida	1990s	Matéria-prima
Yikeman, Shandong, China	PHA (incerto)	3,000	2008-Presente	Matéria-prima
Tianjin Northern Food, China	PHB	Experimental	1990s	Matéria-prima
Shantou Lianyi Biotech Center, China	Vários PHAs	Experimental	1990 - 2005	Embalagens e material de uso médico
Jiangsu Nan Tian, China	PHB	Experimental	1990-Presente	Matéria-prima
Shenzhen O'Bioer, China	Vários PHAs	Desconhecida	2004-Presente	Desconhecido
Tianjin Gren Bioscience (+DSM)	P(3HB4HB)	10,000	2004-Presente	Embalagens e matéria-prima
Shandong Lukang, China	Vários PHAs	Experimental	2005-Presente	Embalagens e material de uso médico

O uso de culturas mistas, lamas activadas provenientes de estações de tratamento, tornou-se uma alternativa interessante às culturas puras (CHUA *et al.*, 2003a, DIONISI *et al.*, 2005b, DIONISI *et al.*, 2004, REIS *et al.*, 2003, SALEHIZADEH *et al.*, 2004).

Comparando com as culturas puras, a produção de PHAs recorrendo a culturas mistas tem múltiplas vantagens: redução de custo no cultivo de culturas para produção de PHAs; necessidade de construção de instalações mais simplificadas, uma vez que não é necessário equipamento e controlo de ambientes esterilizados, podendo assim trabalhar sem risco de contaminação de culturas; reutilização das lamas de estações de tratamento, contribuição para a redução do excesso de produção de lamas e é uma nova forma de reciclar o carbono pela conversão de poluentes orgânicos em plásticos biodegradáveis valorizáveis (CHUA *et al.*, 2003a, SATOH *et al.*, 1998).

3.4 UM PROCESSO DE TRÊS ETAPAS PARA PRODUÇÃO DE PHAS

Um novo processo foi proposto por (MAJONE *et al.*, 1999) para a produção de PHAs envolvendo culturas mistas compreendendo dois ou três passos. O primeiro correspondendo à fermentação acidogénica em anaerobiose da fonte de carbono para obtenção de ácidos orgânicos voláteis (AOV's) e ácidos lácticos, o segundo equivalendo à selecção de uma cultura com elevada capacidade de acumulação de PHAs utilizando o substrato produzido no primeiro passo e o terceiro correspondendo à optimização da produção de PHAs utilizando as culturas seleccionadas no segundo passo.

O processo de dois passos, correspondendo aos passos 2 e 3 da Figura 3.3, é mais utilizado quando se utilizam ácidos orgânicos (A) como fonte de carbono para a produção de PHAs.

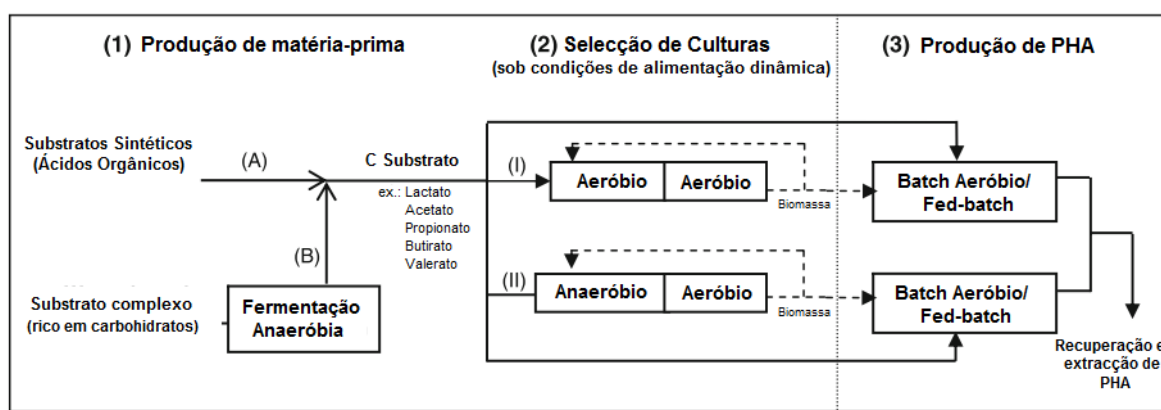


Figura 3.3 – Um processo de três passos para produção de PHAs por culturas mistas utilizando substratos sintéticos (A) ou reais/complexos (B), seguido de uma selecção de culturas utilizando alimentação dinâmica aeróbia (I) ou Anaeróbia/Aeróbia (II) (adaptado de SERAFIM *et al.*, 2008a).

3.4.1 1ª ETAPA – FERMENTAÇÃO ACIDOGÉNICA

O preço dos PHAs é dependente principalmente do custo do substrato, o que representa cerca de 40% dos custos totais de produção (CHOI *et al.*, 1997). Na última década, uma variedade de substratos de carbono de baixo custo (por exemplo, amido de tapioca hidrolisado, soro de leite e melaço) foram testados para a produção de PHAs (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

São conhecidas numerosas espécies microbianas para fermentar compostos orgânicos dissolvidos, nomeadamente ácidos orgânicos, como o ácido acético, propiónico, butírico e láctico, e outros produtos de fermentação, tais como álcoois, em condições anaeróbias.

O facto de os AOV's produzidos nesta fase serem os melhores substratos para a produção de PHAs levou a que esta seja uma etapa cada vez mais considerada e estudada como pré-tratamento para a produção de polímeros (BENGTTSSON *et al.*, 2008, DIONISI *et al.*, 2004).

Em diversos estudos tem sido demonstrado que a composição dos AOV's produzidos por fermentação acidogénica pode ser afectada por condições ambientais tais como pH, tempo de retenção e temperatura. Isto significa que, se a fermentação acidogénica é

usada como uma primeira fase de um processo de produção de PHAs, o controle das condições de processo no fermentador acidogénico é uma forma de afectar as propriedades do polímero PHA produzido.

A digestão anaeróbia é um processo complexo que pode ser caracterizado por 4 sequências principais de degradação: hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese (Figura 3.4).

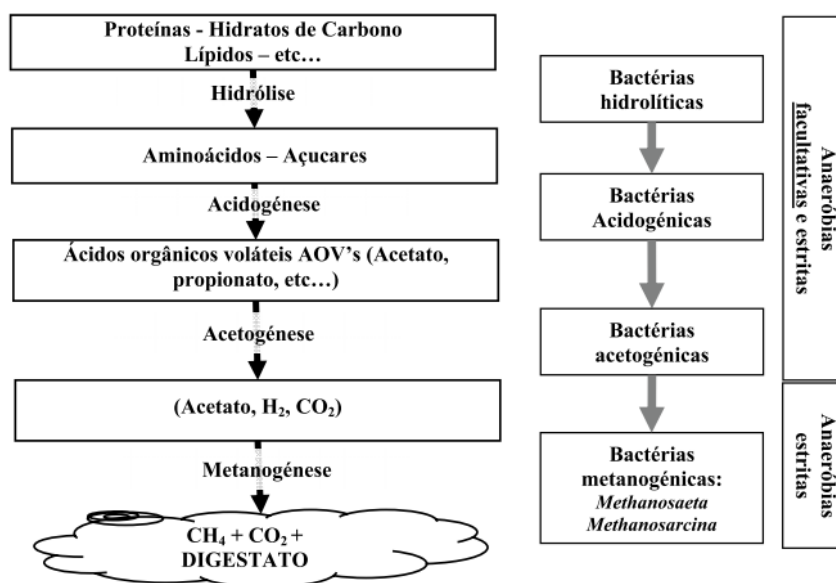


Figura 3.4 – Processo de degradação da digestão anaeróbia, respectivos produtos e bactérias intervenientes (adaptado de TCHOBANOGLOUS *et al.*, 2003).

A fase de **hidrólise** consiste na conversão de compostos de elevado peso molecular (hidratos de carbono, proteínas e lípidos) em moléculas mais reduzidas, monómeros (açúcares, aminoácidos e ácidos gordos, respectivamente), através de enzimas extra-celulares (BHATTACHARYYA *et al.*, 2008, FUENTES *et al.*, 2008).

Quando o substrato é constituído por um teor elevado de sólidos e partículas como os efluentes de suiniculturas, matadouros e lamas, a hidrólise torna-se a fase limitante do processo anaeróbio. Por outro lado, se forem utilizados substratos de composição simples e fáceis de biodegradar, a metanogénese ou a acetogénese, torna-se o passo limitante do processo anaeróbio (VAVILIN *et al.*, 1997, VAVILIN *et al.*, 1996).

Durante a **acidogénese**, ou fermentação ácida, os compostos solúveis resultantes da hidrólise são degradados pelas bactérias fermentativas acidogénicas a AOV's e álcoois de cadeia curta (ex.: etanol) (ANNACHHATRE, 1996, ZOETEMEYER *et al.*, 1982).

Os dois compostos intermediários que se encontram usualmente em maior quantidade, sendo os mais importantes no processo de digestão anaeróbia, são o ácido acético e o ácido propiónico (MCCARTY PL, 1964). No entanto, existe uma série de outros AOV's no processo, como o ácido n-butírico, iso-butírico, valérico, iso-valérico e caproico (VAVILIN *et al.*, 1995).

Na etapa seguinte, **acetogénese**, os produtos da fermentação, propionato e butirato, são transformados, por acção das bactérias homoacetogénicas⁴ e das bactérias sintróficas⁵, em hidrogénio, CO₂ e acetato. Estes produtos finais vão servir de substrato às bactérias metanogénicas (MCCARTY *et al.*, 1986).

A capacidade das bactérias metanogénicas utilizarem hidrogénio, e consequente influenciar a pressão parcial deste no digestor anaeróbio, resulta num papel regulador controlando os tipos de produtos obtidos por bactérias acidogénicas, durante a acidogénese, e define as condições termodinâmicas necessárias para a degradação dos AOV's (MCINERNEY, 1999).

Durante a fase final, a **metanogénese**, os AOV's são convertidos em dióxido de carbono e metano. As bactérias responsáveis por esta fase são estritamente anaeróbias e muito sensíveis a variações do meio. São divididas em dois grupos principais: as acetoclásticas, que utilizam o acetato como substrato e as hydrogenotróficas, utilizadoras de hidrogénio (MCCARTY PL, 1964).

3.4.2 2º PASSO – SELECÇÃO DE CULTURAS

Um dos principais desafios do processo de produção de PHA com culturas mistas é a selecção de culturas. A selecção de uma cultura estável, com uma elevada capacidade de armazenamento de PHAs é de grande importância para a eficácia deste processo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

O intuito da selecção de culturas é o enriquecimento bacteriano onde todas ou quase todas as bactérias possuam elevada capacidade de acumulação de PHAs. Uma cultura que possua microrganismos com várias capacidades de acumulação de polímeros vai levar a que diminua o conteúdo de PHAs em média por célula, aumentando os custos de extracção (SERAFIM *et al.*, 2008a).

O interesse na utilização de culturas mistas para a produção de PHAs tem aumentado nos últimos anos. Estas culturas são compostas por populações microbianas de composição desconhecida capazes de realizar reacções intracelulares e extracelulares específicas, sendo seleccionadas pelas condições operacionais impostas ao sistema biológico. O desenvolvimento da sua capacidade de armazenamento intracelular está intimamente relacionado com as condições operacionais que limitam o seu metabolismo primário (DIAS *et al.*, 2006).

Existem dois tipos de processos para seleccionar culturas a partir de substratos complexos, por um processo anaeróbio/aeróbio (AN/AE) ou por alimentação dinâmica aeróbia (ADF, *Aerobic Dynamic Feeding*) (SERAFIM *et al.*, 2008a).

A remoção biológica de fósforo (EBPR) é um processo de tratamento que consiste na remoção do fósforo inorgânico em excesso de águas residuais. Este sistema é operado

⁴ Homoacetogénicas - produzem acetato a partir de H₂/CO₂ ou de compostos orgânicos multicarbonados (ex.: açúcares)

⁵ Sintróficas- bactérias produtoras obrigatórias de hidrogénio

em ciclos alternados anaeróbios e aeróbios, sendo a maioria dos organismos seleccionados, organismos acumuladores de polifosfatos, PAOs, e acumuladores de glicogénio, GAOs.

De uma forma resumida, num processo EBPR, os microrganismos nas lamas activadas consomem polifosfato como fonte de energia para a captação anaeróbia dos substratos de carbono, estes substratos de carbono captados são temporariamente armazenados como PHAs. Quando as condições se tornam aeróbias, o PHA é utilizado para crescimento e regeneração do polifosfato. Os microrganismos no processo EBPR devem possuir características para remover fosfato e armazenar PHAs. Por estas razões a síntese de PHAs por culturas mistas foi inicialmente observada em estações de tratamento de águas residuais concebidas para remoção do fósforo (SERAFIM *et al.*, 2008a).

3.4.2.1 PROCESSO DE ALIMENTAÇÃO DINÂMICA AERÓBIA, ADF

Desde 1990 que aumentaram os estudos sobre produção de PHAs utilizando este processo, tendo sido somente há poucos anos que se diferenciou entre o segundo e terceiro passos, selecção e acumulação (DIONISI *et al.*, 2005a, SERAFIM *et al.*, 2008a).

Sob operação ADF, as lamas activadas são submetidas a dois períodos consecutivos de disponibilidade ao substrato externo (“fartura”) e de indisponibilidade (“fome”), que gera um crescimento designado desbalanceado, demonstrado na Figura 3.5.

As condições de “fome” e “fartura” levam a dois tipos de adaptação por parte dos microrganismos, dependendo da natureza do substrato e das condições de operação. A biomassa pode acumular o substrato como reserva intracelular (acumulação como resposta), sendo esta a resposta mais rápida uma vez que necessita de menor adaptação fisiológica pelos microrganismos, ou a biomassa pode aumentar o crescimento celular (crescimento como resposta), este fenómeno verifica-se quando o tempo de exposição ao substrato é demasiado prolongado possibilitando aos microrganismos uma adaptação fisiológica (DIONISI *et al.*, 2006c, SERAFIM *et al.*, 2000).

A indisponibilidade de substrato externo, “fome”, durante um determinado período de tempo conduz à diminuição da quantidade de componentes celulares como o ARN (Ácido Ribonucleico) ou enzimas, necessários ao crescimento celular. Devido ao período de “fome”, durante o período de “fartura”, a quantidade de enzimas é mais baixa do que a necessária para uma velocidade de crescimento máxima, μ , resultando em uma resposta lenta ao crescimento. Assim, o fenómeno de armazenamento do substrato em reservas poliméricas internas é geralmente dominante ($\geq 70\%$ em base molC) em relação ao crescimento (DIAS *et al.*, 2006, DIONISI *et al.*, 2006c, MAJONE *et al.*, 1999, SERAFIM *et al.*, 2008a).

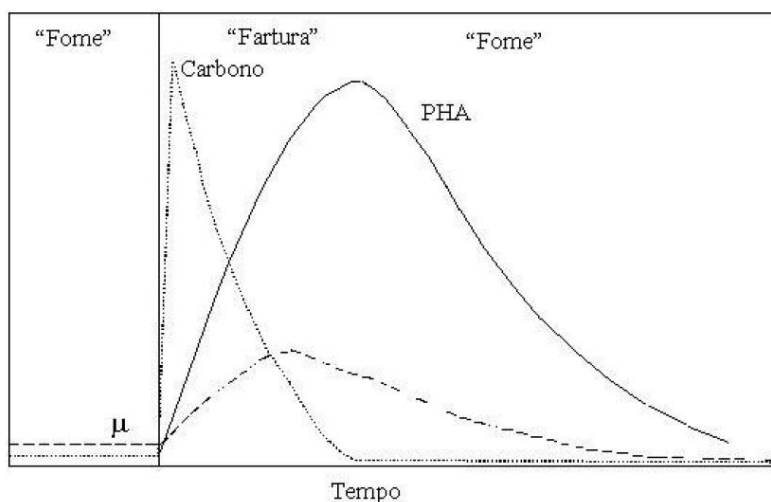


Figura 3.5 - Perfis de concentrações e de velocidade específica de crescimento num processo com culturas mistas submetidas a condições dinâmicas de adição de carbono (SERAFIM *et al.*, 2000).

Neste tipo de processo ADF os microrganismos que possuem a capacidade de armazenar polímeros, como fonte de carbono e energia, podem sobreviver durante a fase de “fome” tornando-se assim dominantes sobre os restantes microrganismos.

A selecção de culturas sob condições ADF já foi testada utilizando resíduos complexos reais, tais como: melaço de cana-de-açúcar fermentado (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007, ALBUQUERQUE *et al.*, 2010), efluentes de lagares de azeite (DIONISI *et al.*, 2005a), efluentes industriais compostos por ácido fórmico, metanol e etilenoglicol (DIONISI *et al.*, 2006a), efluentes fermentados de indústrias de papel, resíduos de tomate de conserva e efluentes fermentados de cervejarias.

São notáveis os avanços que se verificam ano após ano para a produção de biopolímeros a partir de culturas mistas sob condições ADF. Com a utilização de substratos puros o conteúdo máximo de PHAs nas células em lamas activadas foi anteriormente referido entre 50 e 62% do peso seco (BECCARI *et al.*, 1998, SATOH *et al.*, 1998). Este valor foi ultrapassado atingindo 78,5%, utilizando uma estratégia de alimentação de pulso de substrato (SERAFIM *et al.*, 2004).

Recentemente, nos estudos de Johnson *et al.* (2009) foi possível ser seleccionada uma cultura quase pura altamente enriquecida em microrganismos acumuladores de PHA a partir de uma cultura mista. Por manipulação adequada das condições de operação (TRS, T) aplicadas a um SBR alimentado com acetato, Johnson *et al.*, 2009 conseguiu atingir uma capacidade de armazenamento muito elevada com até 89% de conteúdo de PHA. Neste teste foi utilizado um reactor SBR alimentado com acetato com 1d de tempo de residência e com ciclo de 12h, o polímero produzido foi o PHB (JOHNSON *et al.*, 2009).

3.4.2.2 METABOLISMO DE ACUMULAÇÃO DE POLÍMEROS DE RESERVA

Actualmente não existem evidências experimentais do metabolismo efectuado pelas bactérias para produção de PHAs em culturas mistas. É, no entanto, considerado que as vias metabólicas realizadas para o consumo de carbono e armazenamento de polímeros são as mesmas que as referidas para as culturas puras, Figura 3.6 (DIAS *et al.*, 2006, SERAFIM *et al.*, 2008b). De seguida iremos analisar o metabolismo de acumulação de polímeros de reserva de acordo com J. M. L. Dias, *et al.*, 2006.

Considerando o acetato como o único substrato, o acetil-CoA produzido é parcialmente encaminhado para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para crescimento e produção de NADPH, e parcialmente utilizado para produção de PHAs. O PHB é formado a partir da condensação de duas unidades de acetil-CoA produzindo acetoacetil-CoA que é reduzido para hidroxibutiril-CoA em detrimento da NADPH e, finalmente, dá origem ao monómero hidroxibutirato (HB). O PHB é metabolizado quando nenhum substrato externo está disponível (DIAS *et al.*, 2006).

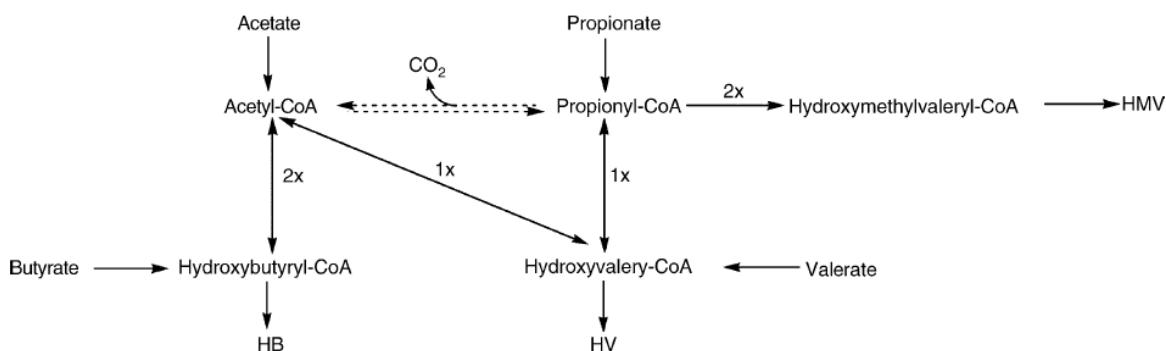


Figura 3.6 – Representação da produção de polímeros a partir do acetato, propionato, butirato e valerato (LEMOS *et al.*, 2006).

Outros ácidos orgânicos voláteis como propionato, butirato e o valerato também podem ser utilizados por culturas mistas para a síntese de diferentes PHAs. O propionato sendo o precursor do propionil-CoA, quando combinado com acetil-CoA gera o monómero hidroxivaleril-CoA, dando origem ao HV (DIAS *et al.*, 2006). A síntese do acetil-CoA torna-se essencial para a produção de HV. Quando a fonte de carbono é somente o propionato, o acetil-CoA pode ser obtido do propionato através de cinco vias metabólicas diferentes: via metilmalonil-CoA, α -hidroxiglutarico, citramalato, acrilóil-CoA e ácido 2-metilcitríco (LEMOS *et al.*, 2006).

Podem ser produzidos outros dois monómeros, em menores quantidades, o hidroximetilvalerato (HMBV), através da junção de dois propionil-CoA e hidroximetilbutirato (HMB), combinando acetil-CoA e propionil-CoA (DIAS *et al.*, 2006).

O butirato e valerato são convertidos a butiril-CoA e valeril-CoA podendo ser usados directamente para a produção dos correspondentes hidroxibutiril-CoA e hidroxivaleril-CoA, dando origem a HB e HV, respectivamente. O hidroxibutiril-CoA pode dar origem a duas unidades de acetil-CoA que podem ser usadas no ciclo TCA e o hidroxivaleril-CoA pode ser parcialmente decomposto para a produção de um acetil-CoA e um propionil-

CoA para energia, crescimento e equivalentes redutores (DIAS *et al.*, 2006, LEMOS *et al.*, 2006).

Este estudo será focado na fase de selecção de culturas para produção de PHAs, limitando-se a misturas de ácido acético e propiónico, uma vez que estes são, de acordo com a literatura, considerados como os mais promissores para a síntese de PHAs de alta qualidade (DIAS *et al.*, 2008, LEMOS *et al.*, 2006).

Quando se utiliza a junção destes dois ácidos, em iguais proporções, como fonte de carbono verifica-se uma produção mais elevada de HV do que de HB. Nestas condições, o acetil-CoA produzido pelo metabolismo do acetato é usado de forma mais extensa para energia e produção de biomassa do que para produção das unidades de 3-hidroxibutirato para a síntese de PHB. Desta forma a síntese dos precursores para a síntese de PHA através da junção de unidades de acetil-CoA com propionil-CoA parece ser favorecida (DIAS *et al.*, 2008, VILLANO *et al.*, 2010).

A fracção de cada monómero de PHA produzido pelas células depende dos fluxos de acetil-CoA e propionil-CoA disponíveis para a produção de polímeros. Depende também se as células tendem a reduzir e condensar acetil-CoA e propionil-CoA de forma aleatória, ou se ocorre ligação preferencial entre, por exemplo acetil-CoA e propionil-CoA (VILLANO *et al.*, 2010).

3.4.3 3º PASSO – ACUMULAÇÃO DE PHAS

A acumulação de PHAs foi durante muito tempo considerada parte integrante da selecção de culturas porém o objectivo deste passo é um pouco diferente. Enquanto que no passo anterior queríamos seleccionar culturas de microrganismos com elevada capacidade de produção de PHAs, neste passo utilizamos essas culturas seleccionadas para maximizar a produção de PHAs.

Este passo é efectuado através de testes batch onde é inoculada uma amostra de biomassa retirada do final da fase de “fartura” alimentada com o mesmo substrato utilizado na fase de selecção de culturas mas a uma maior concentração (VILLANO *et al.*, 2010).

O processo de produção de PHAs culmina com a recuperação de PHAs, este é outro processo que aumenta significativamente o custo de produção. Foram desenvolvidos vários métodos para recuperação de PHAs. O método mais usual é a extracção do P(3HB) com solvente orgânico, como o clorofórmio, dicloroetano, carbonato de propileno e cloreto de metileno. A grande quantidade de solvente necessário para a extracção (20:1; solvente:polímero) torna este método pouco atractivo economicamente, mesmo reciclando os solventes (LEE, 1996a).

Apesar de não ser vantajoso financeiramente, o rendimento deste processo de recuperação é melhor do que a alternativa, a ruptura celular seguida de extracção aquosa, devido à diminuição do peso molecular do biopolímero (LUZIER, 1992, OJUMU *et al.*, 2004).

Foram recentemente revistos quatro métodos de isolamento: extracção com solventes orgânicos, digestão química ou enzimática de material celular que não PHAs, ruptura mecânica das células com utilização de moinhos (esferas) e homogeneização de alta pressão e novos métodos como libertação espontânea de PHB, flutuação por ar dissolvido e extracção utilizando CO₂ supercrítico (JACQUEL *et al.*, 2008).

Apesar de actualmente os processos de recuperação não reunirem os requisitos para um processo eficiente a larga escala, os estudos que estão a ser efectuados aos mais recentes métodos de extracção são uma janela de esperança para uma óptima recuperação de P(3HB), com um elevado grau de pureza, de recuperação e baixo custo de produção (JACQUEL *et al.*, 2008, KESHAVARZ *et al.*, 2010).

3.5 FACTORES OPERACIONAIS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE PHAS

Estudos anteriores, revistos na literatura, revelaram que a produção de PHAs, em lamas activadas é função de factores operacionais e condições nutricionais. A fonte de carbono, a carga orgânica, pH, tempo de retenção dos sólidos (TRS), a temperatura, oxigénio dissolvido e as limitações de nutrientes (azoto e fósforo) surgiram como variáveis importantes para o progresso dos estudos da acumulação de PHA, em lamas activadas (DIAS *et al.*, 2006).

3.5.1 LIMITAÇÃO DE NUTRIENTES C:N:P

A acumulação de PHAs pode ser estimulada sob condições de crescimento desfavorável, como a carência de oxigénio, azoto, fósforo, enxofre, magnésio ou potássio na presença de excesso de carbono.

3.5.1.1 FONTE DE CARBONO

Têm sido realizados uma série de estudos na produção de PHAs com lamas activadas de efluentes sintéticos, contendo ácidos orgânicos, ou utilizando ácidos orgânicos como substrato. Na maioria dos estudos tem sido usado acetato como único substrato para o enriquecimento das culturas mistas, isto porque é o substrato mais facilmente assimilado como fonte de carbono (CHUA *et al.*, 2003b, SATOH *et al.*, 1998, SERAFIM *et al.*, 2004).

Apesar da taxa de produção de polímeros e a produtividade dependerem das condições operatórias e muitas vezes a diferença de polímeros produzidos poder advir de diferenças da população microbiana, estão representados na Tabela 3.3 alguns estudos efectuados recentemente onde se pode analisar o rendimento e taxa de produção de PHAs em relação a diversos substratos utilizados.

Tabela 3.3 – Produção de biopolímeros por culturas mistas utilizando diversos substratos orgânicos (adaptado de DIAS *et al.*, 2006, JOHNSON *et al.*, 2009).

Substrato	Substrato	Rendimento de armazenamento PHA	PHA taxa de produção	Teor de PHA	Composição do PHA
	g .L ⁻¹	g PHA . g ⁻¹ substrato	g PHA . g ⁻¹ peso seco de células . h ⁻¹	%	mol : mol
Acetato / propionato / lactato (40% / 20% / 40%)	7,5	0,29	0,52	46,0	P (HB / HV) 69:31
	17,6	0,46	0,39	45,0	SI*
Propionato	≈ 0,25	0,35	0,068	SI	PHV
Lactato	≈ 0,25	0,20	0,43	SI	PHB
Acetato	3 x 1,8	0,56	0,77	65,0	PHB
Propionato	0,63	0,30	0,09	13,6	P (HB/HV/HMV) 12:61:27
Propionato + acetato	0,75	0,37	0,46	25,4	P (HB/HV/HMV) 54:33:13
Acetato + glucose	0,36 + 0,36	0,43-0,65	0,16-0,27	SI	PHB
Ácido glutâmico	1,2	0,058	0,0046	SI	PHB
Butirato	0,53	0,44	0,068	14,5	PHB
Valerato	0,47	0,37	0,072	14,3	P (HB/HV/HMV) 32:52:16

*SI – sem informação

Já foram efectuados muitos estudos com várias combinações e concentrações de substratos como propionato, butirato, lactato, succinato, piruvato e malato. Tendo em consideração a Tabela acima verifica-se que são os testes efectuados com acetato, lactato e valerato que possuem melhores resultados em termos de produtividade, com 0,77, 0,43 e 0,072 gPHA.g⁻¹ peso seco de cél.h⁻¹, respectivamente. No caso de misturas de substratos os estudos que possuem maior produtividade são aqueles que incluem acetato como um dos constituintes, Acetato / propionato / lactato (40% / 20% / 40%) com 0,52 gPHA.g⁻¹ peso seco de cél.h⁻¹ seguido de mistura de propionato e acetato com 0,46gPHA.g⁻¹ peso seco de cél.h⁻¹.

Tabela 3.4 - Produção de biopolímeros por culturas mistas utilizando diversos substratos reais complexos (DIONISI *et al.*, 2005a, SERAFIM *et al.*, 2008a)

Substrato	Carbono total	Rendimento de armazenamento PHA	PHA taxa de produção	Teor de PHA	Composição do PHA
	mg .L ⁻¹	g PHA . g ⁻¹ substrato	gPHA .XCQO ⁻¹ .h ⁻¹	%	mol : mol
Melaço fermentado	9 225	0,63	0,13	33	P(3HB/3HV) 83:17
Efluentes fermentados de indústrias de papel	140	0,71	0,054	48.2	P(3HB/3HV) 39:61
Efluentes industriais	104	0,14	0,0082	SI	SI
Efluentes de indústrias de tomate de conserva	535	0,075	0,018	20	P(3HB)
Efluentes de indústrias de tomate de conserva	5 040	0,83	0,151	45	P(3HB/3HV) 83:17
Lamas primárias	2 445	0,84	0,059	32	P(3HB/3HV) 35:65
Efluentes fermentados de cervejarias	1 950	0,59 CmM/ CmM ^a	0,13 CmM/ CmM ^a	38	SI
Efluentes de lagar de azeite	SI	1,05	0,57	54	P (HB /HV) 96:4

^a - sem informação suficiente para conversão de unidades; SI - sem informação

Porém, o estudo de produção de PHAs, não se resume à utilização de substratos orgânicos directamente alimentados às culturas. Têm também sido alvo de estudo efluentes complexos reais, Tabela 3.4, melaço de cana-de-açúcar fermentado, efluentes de lagares de azeite, efluentes industriais compostos por ácido fórmico, metanol e etilenoglicol, efluentes fermentados de indústrias de papel, efluentes de indústrias de tomate de conserva e efluentes fermentados de cervejarias.

Os substratos que obtiveram melhores resultados em termos de rendimento de armazenamento de polímeros foram os efluentes de lagares de azeite com $0,57 \text{ gPHA.g}^{-1}$ peso seco de cél.h⁻¹ e os efluentes de indústrias de tomate de conserva $0,151 \text{ gPHA.g}^{-1}$ peso seco de cél.h⁻¹.

3.5.1.2 RÁCIO C:N

Chua *et al.*, 1997, e Wang *et al.*, 2007, estudaram o efeito de diferentes valores de rácios C:N na produção de polímeros em SBR com lamas activadas. Nestes estudos foram estudados rácios C:N de 20 a 140 e 24 a 144, respectivamente. Foi possível apurar, em ambos os estudos, que o armazenamento dos polímeros aumentou com o aumento do rácio até ao valor de rácio C:N de 96 e 100, respectivamente. No estudo de Wang *et al.* (2007) quando o rácio C:N atingiu o valor de 100 o reactor entrou em uma condição de insuficiência de azoto, o crescimento celular diminuiu, porém a acumulação de polímeros aumentou.

Com aumento do rácio C:N acima de 100 o crescimento celular diminuiu e a acumulação de polímeros manteve-se praticamente inalterada. O facto de haver um declínio do crescimento celular indica-nos que as condições de insuficiência de azoto afectam o normal crescimento celular e síntese citoplasmática da biomassa (WANG *et al.*, 2007).

Tanto no estudo de Chua *et al.*, 1997, como no estudo de Wang *et al.*, 2007, foi concluído que o azoto é importante para o normal crescimento celular mas não é propício à acumulação de polímeros, devendo o reactor manter-se com um rácio à volta de 24 e 20, respectivamente, para permitir o funcionamento normal da síntese celular microbiana (CHUA *et al.*, 1997).

A ausência de azoto leva à inexistência de crescimento celular e não há aumento do armazenamento de polímeros (DIONISI *et al.*, 2005b).

3.5.1.3 RÁCIO C:P

Embora existam alguns estudos sobre o efeito da limitação de fósforo na produção de PHAs, o estudo mais recente diz respeito a um teste de rácios C:P (w/w) de 100, 160, 250, 500 e 750 (WEN *et al.*, 2010).

A produção de PHAs neste estudo variou de rácios PHB/PHA de 0,70 para C:P de 100 (w/w) a 0,99 com C:P de 750 (w/w). Segundo esta análise, efectuada por Wen, *et al.* (2010), a percentagem de acumulação de PHAs aumenta com o aumento do rácio C:P. Veio a concluir também que a biomassa de lamas activadas tende a produzir mais PHB do que PHV sob o stress de limitação de fósforo.

3.5.2 CARGA ORGÂNICA

Dionisi *et al.*, 2006c, analisou o efeito da aplicação de diferentes cargas orgânicas, na gama 8,5 – 31,25g CQO/L/dia, em termos da produção de biomassa e capacidade de armazenamento de polímeros.

Foi observado que para cargas orgânicas baixas a capacidade de armazenamento dos microrganismos foi rápida o suficiente, inferior a 30min, para rapidamente remover todo o substrato na fase de fartura, estabelecendo-se rapidamente o regime fome e fartura. Para estas cargas menores (8,5 a 12,75 gCQO.L⁻¹.d⁻¹) foram favorecidos os microrganismos que armazenam polímeros tornando-se dominantes. Para altas cargas orgânicas (25 a 31,25 gCQO.L⁻¹.d⁻¹) a fracção de microrganismos com capacidade de armazenamento não removeu todo o substrato rapidamente e este ficou disponível para o crescimento dos microrganismos por um período de tempo mais alargado, 60min.

A carga de 20 foi considerada como carga de transição podendo ou não ter capacidade de armazenamento de polímeros.

Como resultados, para cargas orgânicas entre 8,5-20 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ deu-se a maior capacidade de armazenamento 0,39–0,46 gPHA.L⁻¹.h⁻¹ e para cargas entre 20-31,25 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ temos menor capacidade de armazenamento de 0,05-0,16 gPHA.L⁻¹.h⁻¹.

Para ocorrer a selecção de microrganismos com o máximo de capacidade de acumulação de polímeros é necessário começar a selecção a cargas orgânicas baixas e ir aumentando gradualmente a carga. Podemos dizer que a carga óptima para selecção de microrganismos com capacidade de acumulação de polímeros se encontra na gama de 8,5-20gCQO.L⁻¹.d⁻¹.

De acordo com este estudo a razão entre a extensão da fase de fartura e a extensão de todo o ciclo não deve exceder aproximadamente 0,25, para evitar a selecção de microrganismos com resposta de crescimento (DIONISI *et al.*, 2006c).

3.5.3 PH

O efeito do pH na acumulação de PHAs durante o segundo e terceiro passo tem sido alvo de alguns estudos. Os testes de pH efectuados por Dionisi, *et al.* (2005a) e Villano, *et al.*, 2010, na gama de pH de 4,5 a 10,5 e de valores de pH de 7,5, 8,5 e 9,5, respectivamente com prévia aclimatização a pH de 7,5 e 8,5, respectivamente, demonstraram que em todos os valores de pH, a biomassa manteve a capacidade de remoção de substrato e armazenamento de PHAs.

Nos testes de Villano, *et al.*, 2010, a taxa de remoção do substrato e a taxa de produção de PHAs era mais elevada a pH 8,5, o mesmo pH da aclimatização, aumentando com o aumento do pH. A fracção de HV armazenado também aumentou com o aumento de pH. O mesmo se verificou nos testes de Dionisi, *et al.* (2005a) onde a taxa de remoção máxima correspondeu ao mesmo valor de pH da aclimatização, mas na gama de 6,5 a 9,5 a biomassa demonstrou uma actividade significativa (70% de remoção de substrato a pH 7,5). Com a diminuição do pH para valores de 5,5 a actividade da biomassa era baixa

e praticamente inexistente a valores extremos de 4,5 e 10,5. A capacidade de armazenamento é quase independente do pH na gama 6,5 a 8,5.

Podemos dizer que os valores de pH na gama de 7,5 a 9 dão os valores mais elevados de produção de PHAs. É também possível afirmar que o pH afecta a composição do polímero de reserva: a fracção de HV aumenta com o aumento de pH (VILLANO *et al.*, 2010).

É importante referir que os substratos utilizados em cada um dos testes também afectam o pH, segundo Dionisi, *et al.* (2005a) com o aumento do pH dá-se um aumento da fracção de ácido propiónico utilizado para armazenamento em detrimento da fracção utilizada para oxidação ou crescimento.

Existem três processos principais que afectam o pH numa cultura mista, a absorção do substrato (ácido orgânico), diminuindo a concentração do ião hidrogénio em solução, a assimilação do NH_3 , aumentando a concentração de iões hidrogénio, resultando da não assimilação do ião H^+ do NH_4^+ pelas células e a produção e transferência de CO_2 resultando na acumulação de CO_2 na fase líquida, aumentando a concentração do ião hidrogénio devido ao sistema ácido/base do bicarbonato e carbonato (DIAS *et al.*, 2006).

3.5.4 TEMPO DE RETENÇÃO DE SÓLIDOS

O TRS determina, teoricamente, o tempo médio de vida microbiana e a população microbiana. Chua, *et al.*, 2003b, investigou o efeito da variação do TRS (3 e 10 dias) na produção de PHAs utilizando acetato como fonte de carbono. Foi observado pelos resultados que quanto mais longo o TRS, maior a concentração de biomassa no reactor. Os microrganismos no reactor com MLSS mais baixo obtinham mais substrato que aqueles com MLSS elevado. Isto deve ter conduzido a que houvesse maior produção de PHAs em microrganismos com MLSS baixo. Para complementar, os processos de lamas activadas com altos TRS normalmente contém uma elevada quantidade de biomassa inerte, o que também contribui para um baixo conteúdo em PHAs.

3.5.5 TEMPERATURA

A influência da temperatura na capacidade de armazenamento de polímeros, em um SBR de culturas mistas alimentado com acetato, foi estudada por (KRISHNA *et al.*, 1999). A produção de PHB foi investigada a (15, 20, 25, 30 e 35°C). Foi possível verificar que o armazenamento de polímeros depende fortemente da temperatura, a velocidade de formação de PHB diminuiu com o aumento da temperatura devido ao aumento das taxas anabólicas a temperaturas superiores.

De igual forma e recentemente, (CHINWETKITVANICH *et al.*, 2009), estudou o efeito da temperatura na produção de PHAs em culturas mistas. Foi analisado um conjunto de três temperaturas, 10, 20 e 30°C em condições transientes de alimentação de N&P. Também neste estudo foi verificado que a acumulação de PHAs combinado com condições limitantes de N e P é inversamente correlacionada à temperatura, a acumulação diminuiu

de 427 e 204 para 148 mg.L⁻¹.d⁻¹ com o aumento de temperatura do reator de 10 para 20 e 30°C.

3.5.6 OXIGÉNIO DISSOLVIDO

A produção de PHAs em culturas mistas tem sido intensivamente estudada nos últimos anos, porém tem sido dada pouca atenção ao efeito da taxa de fornecimento de oxigénio na conversão do substrato a PHAs (THIRD *et al.*, 2003).

Third, *et al.*, 2003, estudou o efeito do oxigénio dissolvido em culturas mistas alimentadas a acetato. Segundo este estudo a taxas inferiores de fornecimento de OD (com k_L 6 a 16 h⁻¹, 0 mg.L⁻¹ OD), uma maior proporção do substrato foi convertida a PHB do que acontece com as taxas mais elevadas de fornecimento de OD (com k_L 30 a 51 h⁻¹, OD > 0,9 mg.L⁻¹). Até 77% dos equivalentes redutores disponíveis a partir de acetato foram convertidos a PHB sob restrição de oxigénio, contra apenas 54% em condições de oxigénio em excesso.

Segundo Third, *et al.*, 2003, para baixas concentrações de OD, a limitação da disponibilidade de adenosina trifosfato (ATP) impede o crescimento significativo da biomassa tendo sido utilizado mais ATP para o transporte de acetato para as células. Em oposição, as taxas elevadas de fornecimento de OD gera um excedente de ATP e, portanto, as taxas de crescimento de biomassa tornam-se mais elevadas, resultando na diminuição da produção de PHB.

⁶ k_L - coeficiente de transferência de massa de lamas do líquido

CAPÍTULO 4

MICROBIOLOGIA – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 CONSTITUIÇÃO DO LICOR MISTO

Apesar dos sistemas de lamas activadas serem operados desde aproximadamente 100 anos, pouco se entendia da sua microbiologia até recentemente, nomeadamente quais os tipos de organismos existentes, ou mais importante, qual o seu papel no processo, que era em grande parte um mistério. A metodologia utilizada até então, de isolamento e cultura individual de microrganismos para a tentativa de identificação, era inadequada para demonstrar a biodiversidade em sistemas tão complexos (SEVIOUR *et al.*, 2010).

Os sistemas de lamas activadas são constituídos por aproximadamente 95% de bactérias e 5% de outros organismos, como os protozoários e metazoários. Nestes sistemas grande parte da biomassa não se encontra suspensa livremente no licor misto, e é constituída por uma parte orgânica e outra inorgânica que se agregam formando os flocos (YAN *et al.*, 2009). Em torno destes flocos e no seio do líquido, para além das bactérias livres, encontram-se também protozoários e metazoários, podendo ainda ser encontrados fungos. Estes grupos possuem relações de predação, competição e canibalismo (CANLER *et al.*, 1999).

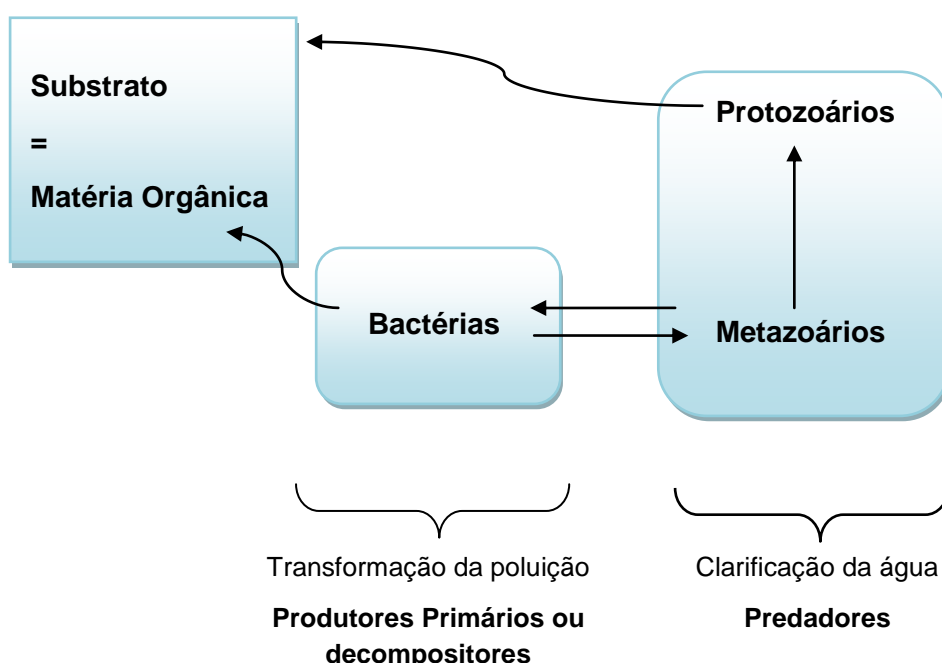


Figura 4.1 – Rede trófica num sistema de lamas activadas (CANLER *et al.*, 1999).

A biodiversidade dos sistemas biológicos resulta da contínua competição pela alimentação, Figura 4.1. O crescimento dos decompositores, predominantemente bactérias heterotróficas, depende da qualidade e quantidade de matéria orgânica dissolvida no licor misto. Para os predadores, por outro lado, o crescimento depende da disponibilidade de presas. As bactérias dispersas constituem o alimento para flagelados heterotróficos e ciliados bacteriófagos que, por sua vez, se tornam presas dos organismos carnívoros. As relações de competição e predação criam oscilações e sucessões das populações até a estabilidade dinâmica ser atingida (MADONI, 2003, THOMAZ, 1999).

4.1.1 FLOCOS

Os flocos são constituídos por material biológico e não biológico. São estruturas heterogêneas complexas compostas por agregados bacterianos e outros organismos rodeados por uma matriz polimérica, muitas vezes referida como substância polimérica extracelular (SPE) (SEVIOUR *et al.*, 2010).

A maioria das bactérias existe como microcolonias ou microflocos ligados à estrutura do floco, apesar de algumas estarem presentes como células individuais ou bactérias filamentosas (SEVIOUR *et al.*, 2010). A formação de flocos ocorre naturalmente com o aumento do tempo de residência dos sólidos (TRS) e é iniciada por bactérias formadoras de floco. Segundo Jenkins *et al.*, 2004, os géneros principais de bactérias heterotróficas com capacidade de formação de flocos são *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Citromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, e *Zoogloea*. Estas bactérias são capazes de produzir três componentes celulares necessários, que lhes permitem aglomerar. Estes componentes celulares são i) pili ou fímbrias, ii) polissacarídeos viscosos, e iii) poli- β -hidroxibutirato (PHB) ou grânulos de amido (GERARDI, 2006).

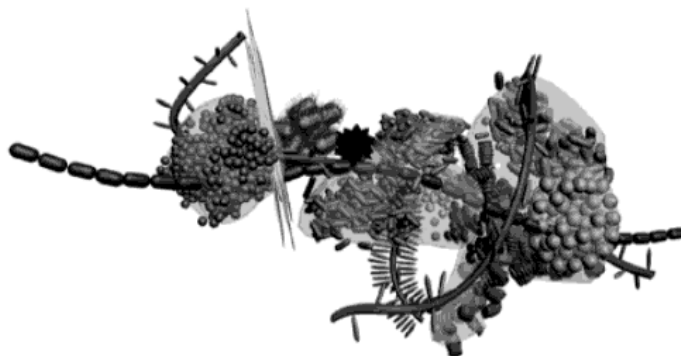


Figura 4.2 – Representação da estrutura dos flocos de lamas activadas (SEVIOUR *et al.*, 2010).

Existem dois níveis de estruturação nos flocos das lamas activadas, a micro e macroestrutura. A microestrutura diz respeito à agregação microbiana, à adesão e à biofloculação. A macroestrutura consiste na formação de redes, por organismos filamentosos, dentro dos flocos de organismos aos quais as bactérias formadoras de flocos aderem. Esta rede de organismos filamentosos proporciona aos flocos maior resistência e maiores dimensões. Como consequência, a sua integridade é preservada quando há aumento das condições de fraccionamento em ambientes turbulentos (JENKINS *et al.*, 2004).

4.1.2 POLÍMEROS EXTRACELULARES, SPE

As lamas activadas exibem uma estrutura matricial que inclui outros componentes da biomassa além das bactérias metabolicamente activas. Esta estrutura livre, na qual as bactérias são unidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) é crucial para a estabilidade dos flocos da biomassa. Esta matriz é capaz de capturar partículas inorgânicas, o que aumenta o peso dos flocos e melhora a sua sedimentação. No entanto, a função exacta do conteúdo e a composição destas substâncias na

determinação da estabilidade dos flocos das lammas ainda não está totalmente estudada (SHENG *et al.*, 2006).

As SPE são materiais extra-celulares viscosos segregadas por células e estão envolvidas nos fenómenos de aderência, na formação da estrutura da matriz, no controlo da fisiologia microbiana e na estabilidade a longo prazo das lammas (MCSWAIN *et al.*, 2005, SHENG *et al.*, 2006, SU *et al.*, 2005).

As SPE são compostas por diversos biopolímeros de alto peso molecular (por exemplo, hidratos de carbono, proteínas, substâncias húmicas⁷, ácidos nucleicos) que contêm vários grupos funcionais capazes de participar em interacções (LIU *et al.*, 2002). Isto porque as ligações efectuadas entre as células bacterianas são devidas a interacções intermoleculares, como forças de Wan der Waals, forças electrostáticas, pontes de SPE por catiões de multivalência, interacções hidrofóbicas, entre outras (SHENG *et al.*, 2006).

A estabilidade dos flocos também é afectada pelas condições ambientais nos bioreactores. Um aumento no pH externo induz a ionização de muitos grupos funcionais (por exemplo, os grupos carboxílicos em proteínas e hidratos de carbono) na SPE microbiana (WINGENDER *et al.*, 1999). Isso resulta em maior repulsão entre as células e entre as SPE e células e, portanto, enfraquece a estabilidade dos flocos biológicos. Os catiões divalentes, principalmente Ca^{2+} e Mg^{2+} , desempenham um papel importante na ligação entre o ião SPE da matriz e as células. Ao retirar esses catiões utilizando um agente quelante, por exemplo, o EDTA, a matriz de SPE tende a desmoronar, causando a desintegração da estrutura dos flocos (SHENG *et al.*, 2006).

4.1.3 PROTOZOÁRIOS E METAZOÁRIOS

A presença dos protozoários é fundamental para o sistema atingir um bom desempenho. Além de reduzirem a turbidez do efluente final, através da predação da maioria das bactérias dispersas no licor misto, estimulam o crescimento bacteriano, promovem a floculação e algumas espécies ainda eliminam a poluição (SOBRINHO *et al.*, 2005).

Os protistas constituem cerca de 9% do peso seco dos sólidos em suspensão. Há conhecimento da existência de mais de 200 espécies de protistas, dos quais 33 flagelados, 25 rizópodes, 6 actinopodes e 160 ciliados, em vários tipos de sistemas de tratamento aeróbio. Este número é, evidentemente, apenas uma pequena parte dos milhares de espécies de protozoários de água doce que poderiam teoricamente ser observadas nesses ambientes (MADONI, 2003).

Foram identificadas três fases correspondendo à estabilização do sistema (MADONI *et al.*, 1984). A fase inicial é caracterizada por bacteriófagos nadadores livres, ciliados e flagelados provenientes das descargas, não podendo desta forma ser considerados componentes típicos destes meios. Com a formação dos flocos no sistema de lammas activadas, a competição destes organismos com as espécies presentes melhor adaptadas a essas condições faz com que decresçam rapidamente em número (MADONI *et al.*, 1984).

⁷Substâncias húmicas - moléculas que se originam da degradação de matéria orgânica

A segunda fase é um período de transição, e é caracterizada pelo forte crescimento dos ciliados típicos do habitat presente nos tanques de arejamento. Nesta fase, a comunidade é constituída por uma grande diversidade de espécies, mas estas são rapidamente substituídas com a progressiva formação das lamas activadas. As formas de vida nadadoras livres estão envolvidas apenas durante os primeiros dias de colonização e são gradualmente substituídas pelas formas sésseis e móveis de fundo. Nestas duas primeiras fases são mais comuns espécies como *Colpidium sp.*, *Cyclidium sp.* e *Paramecium sp.* (MADONI *et al.*, 1984).

A fase de estado estacionário é caracterizada por uma comunidade de ciliados cuja estrutura reflecte a condição estável do ambiente no tanque de arejamento, com um equilíbrio entre a carga orgânica e as lamas que são produzidas, removidas e recirculadas. Esta fase é caracterizada pela presença de peritríquios sésseis como *Vorticella*, *Epistilis*, *Opercularia* e ciliados móveis de fundo como *Aspidisca* (MADONI *et al.*, 1984).

Quando em pleno funcionamento não existem espécies características das fases de colonização (primeira e segunda fases), a menos que ocorram disfunções que causem a regressão nas condições ambientais, tais como a quantidade de lamas, o grau de arejamento, o tempo de retenção de lamas e a carga orgânica de entrada (MADONI *et al.*, 1984).

A grande maioria dos autores, Madoni *et al.*, 1984, Figueiredo *et al.*, 1997, e Jenkins *et al.*, 2004, agrupam a microfauna presente nas lamas activadas, conforme descrições na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Quadro síntese da microfauna presente em lamas activadas.

Grupos	Classificação	Descrição sucinta
Ciliados	Ciliados móveis de fundo	Possuem a célula achatada dorsoventralmente e cílios modificados e agrupados na parte do corpo que fica em contacto com o substrato. São vorazes predadores de bactérias.
	Ciliados Nadadores Livres	Possuem cílios distribuídos regularmente por toda a célula e nadam livremente entre os flocos. São predadores e carnívoros.
	Ciliados fixos, sésseis	Ficam unidos ao substrato por um pedúnculo, sendo algumas espécies, coloniais. Os cílios encontram-se na região anterior do corpo, próximo à cavidade oral.
Amebas	Tecamebas	Possuem revestimento externo constituído por proteínas, sílica, calcário, ferro, etc.
	Amebas nuas	Não possuem forma definida, têm corpo mole.
Flagelados	Zooflagelados	São flagelados não pigmentados e podem ter de um a vários flagelos. Ingerem matéria sólida ou substâncias orgânicas e inorgânicas dissolvidas.
Micrometazoários	Rotíferos, Nematóides, Anelídeos, Tardígrados	São organismos pluricelulares de vários filos. Possuem lenta taxa de crescimento, sendo a maioria composta por predadores de bactérias e protozoários.

4.1.3.1 CILIADOS

A maioria dos ciliados presentes em instalações biológicas de tratamento de águas residuais alimenta-se de populações dispersas de bactérias. Os ciliados bacteriófagos podem ser subdivididos em três grupos funcionais com base no comportamento (MADONI, 2003):

- Nadadores livres: encontram-se uniformemente dispersos no decantador e alimentam-se de bactérias presentes no licor misto;
- Móveis de fundo: apesar de serem formas livres, habitam a superfície dos flocos das lamas ou do biofilme, alimentando-se das bactérias presentes na sua superfície;
- Sésseis: firmemente fixados aos flocos por meio de um pedúnculo, alimentando-se de bactérias dispersas. Eles estão estreitamente interligados com os flocos das lamas, sedimentando com os flocos, estão associados a valores de índice de volume de lamas (SVI) inferiores a 200. Para valores de SVI por volta de 400 estes ciliados reduzem drasticamente em número (PAGNOTTA *et al.*, 1979).

Os ciliados sésseis apresentam resistência mais elevada para cargas orgânicas elevadas. A sua densidade pode aumentar rapidamente para mais de 80% da fauna total em condições transitórias como o rápido aumento da carga orgânica devido a perda ou extracção de lamas ou à variação de forma descontínua da carga orgânica (MADONI, 2003).

4.1.3.2 FLAGELADOS

Em lamas activadas estes sofrem competição por parte dos ciliados bacteriófagos e sofrem predação por parte de outros ciliados. Muitas das espécies encontradas nas lamas activadas alimentam-se de matéria orgânica solúvel e a sua presença pode indicar níveis de carência bioquímica de oxigénio (CBO) elevadas. Os flagelados podem ser os únicos protozoários presentes em lamas com elevada carga orgânica (superior a 0,9 kgCBO₅/kg SSV.d) (CRUDS *et al.*, 1970, JENKINS *et al.*, 2004).

Como são sujeitos a competição e predação não se encontram em grande número em processos de lamas activadas. Quando existe uma presença elevada destes microrganismos em lamas maduras, estamos perante uma instalação cujo mau desempenho biológico se pode dever a um arejamento insuficiente ou a carga orgânica demasiado elevada (JENKINS *et al.*, 2004).

4.1.3.3 AMEBAS

As amebas crescem em matéria orgânica particulada e são capazes de tolerar baixos índices de oxigénio dissolvido. Um aumento rápido destas pode indicar uma elevada quantidade de matéria orgânica particulada (JENKINS *et al.*, 2004).

Algumas espécies possuem uma carapaça dura chamada teca, como a *Arcella sp.*. Estas são muito abundantes nas lamas com baixa carga orgânica, baixos valores de índice de volume de lamas, longo tempo de retenção e alta concentração de oxigénio dissolvido (MADONI, 2003).

Estas espécies são substituídas por ciliados sésseis, *Operculária* e ciliados nadadores quando a carga é elevada, superior a 1kg CBO₅/kg SSV.d e o valor de CQO do efluente é elevado (MADONI, 2003).

4.1.3.4 MICROMETAZOÁRIOS

Estes estão representados por dois grupos importantes, os rotíferos e as formas de vida mais evoluídas.

Os rotíferos são mais complexos que os protozoários, ocorrem em uma vasta gama de TRS, sendo alguns deles indicadores de elevado TRS (JENKINS *et al.*, 2004).

As formas de vida mais evoluídas são constituídas por nematodes, tardígrados, como *Macrobious sp.*, gastrótricos e anelídeos como *Nais sp.* e *Aeleosoma sp.*. Devido à sua baixa taxa de crescimento, os nematodes só são observados a TRS elevados (JENKINS *et al.*, 2004).

4.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PHAS

Os microrganismos produtores de PHAs são usualmente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pertencentes a pelo menos 75 géneros diferentes (SERAFIM *et al.*, 2000).

As bactérias podem ser divididas em dois grupos de acordo com as suas características de acumulação de PHAs. O primeiro grupo de bactérias requer a limitação de nutrientes essenciais como azoto, magnésio, fósforo ou enxofre para a síntese de PHA a partir de uma fonte de carbono em excesso. As bactérias incluídas neste grupo são *Alcaligenes eutrophus* (agora renomeado de *Ralstonia eutropha*), *Protomonas extorquens* e *Protomonas oleovorans*. O segundo grupo de bactérias, que incluem *Alcaligenes latus*, uma espécie mutante de *Azotobacter vinelandii*, e *Escherichia coli recombinante*, não necessitam de limitação de nutrientes para a síntese de PHAs e podem acumular polímeros durante o crescimento. Estas características devem ser tomadas em consideração quando se efectua a produção de PHAs (KHANNA *et al.*, 2005, WANG *et al.*, 1997).

Para a produção à escala industrial, as bactérias mais favoráveis, tendo em conta a grande variedade de substratos que podem utilizar são: *Azotobacter sp.*, *Methylobacterium sp.*, microrganismos recombinantes: *R. eutropha recombinante* e *E.coli recombinante* (FORMOLO *et al.*, 2003).

Alguns dos microrganismos produtores são citados a seguir:

4.2.1 *RALSTONIA EUTROPHA*

Esta espécie tem sido mais estudada devido à sua capacidade de acumular grandes quantidades de PHB a partir de fontes simples de carbono.

Ralstonia eutropha é o organismo mais interessante para produção industrial de biopolímero, visto que podemos acumular mais de 80% de sua massa celular em P(3HB) com alto peso molecular (BYROM, 1987). Sintetiza PHAs constituídos por monómeros de 3HV, 3HB, 4HB e 5HV quando proporcionado ácido valérico ou propiónico e utiliza diversos substratos, como frutose, açúcares invertidos de cana-de-açúcar e o soro de leite fermentado. Além da produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) *R. eutropha* pode ser utilizada para produção de vários outros biopolímeros (FORMOLO *et al.*, 2003, KHANNA *et al.*, 2005).

4.2.2 *ALCALIGENES LATUS*

Alcaligenes latus é classificado como um produtor de biopolímero associado ao seu crescimento, tem elevada velocidade específica de crescimento e apresenta grande vantagem de poder utilizar diversos substratos baratos de carbono (KHANNA *et al.*, 2005).

A produção de PHB foi melhorada de 50%, em condições não limitantes (YAMANE *et al.*, 1996), para 87% sob limitação de hidrogénio (WANG *et al.*, 1997). Esta espécie produz PHB a uma taxa semelhante à *R. eutropha* (KHANNA *et al.*, 2005).

Como desvantagem, *A. Latus* apresenta sensibilidade aos percursos utilizados na produção de P(3HB-co-3HV), tendo o seu crescimento completamente inibido para valores de concentração de ácido propiónico de 0,5 g/L (FORMOLO *et al.*, 2003).

4.2.3 *BACTÉRIAS DO GÉNERO PSEUDOMONAS*

As bactérias do género *pseudomonas* podem produzir a partir de substratos contendo alcanos ou ácido alcanóico, PHAs de cadeia média ou longa. A formação de PHAs intracelulares tem sido demonstrada em *Pseudomonas oleovorans* cultivadas em meios contendo ácidos n-alcanóicos, no entanto, a formação de PHAs foi observada somente para hexanoatos e ácidos n-alcanóicos superiores (KHANNA *et al.*, 2005).

Foram testadas outras espécies de *Pseudomonas*, tendo a acumulação de polímeros sido verificada para *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluoresces* e *P. testosteroni* numa larga variedade de substratos (FORMOLO *et al.*, 2003).

4.2.4 *ESCHERICHIA COLI*

A *E. coli recombinante* tem sido utilizada para a produção de vários biopolímeros, principalmente proteínas. A *E. coli recombinante* (com genes clonados da biossíntese de PHA de *Ralstonia eutropha*) é capaz de acumular grandes quantidades de polímero, chegando a mais de 90% da biomassa em polímero (LEE *et al.*, 1995).

Não possuem despolimerases intracelulares que degradam o polímero à medida que ele é acumulado e podem utilizar várias fontes de carbono, permitindo a utilização de matérias-primas de baixo custo. A desvantagem é a filamentação das células que diminui a velocidade de crescimento celular e diminui a actividade metabólica, o que provoca um decréscimo na acumulação de polímeros (FORMOLO *et al.*, 2003, KHANNA *et al.*, 2005).

4.2.5 *AZOTOBACTER SP*

Azotobacter sp. foi a primeira bactéria utilizada para a síntese industrial de P(3HB) por conseguir utilizar glicose e sacarose como substrato. O facto de ela produzir um polissacarídeo paralelamente à produção de P(3HB) faz com que o processo seja de difícil controle, afastando a escolha desta bactéria para produção industrial. A espécie *Azotobacter vinelandii* mutante possui a capacidade de armazenar mais de 75% de P(3HB) em massa seca (FORMOLO *et al.*, 2003).

4.3 PRINCIPAIS PROBLEMAS EM SISTEMAS DE LAMAS ACTIVADAS

São muitos os problemas que podem ocorrer durante a operação de um sistema de lamas activadas e que podem afectar negativamente a qualidade dos efluentes. O que é mais importante é gerir, desenvolver e efectuar a manutenção do sistema de lamas activadas de forma a favorecer o seu bom funcionamento.

Os principais problemas (Tabela 4.2) que se encontram nos sistemas de lamas activadas que afectam a qualidade do efluente final são: crescimento disperso (não sedimentável), “*pin floc*”, *bulking* zoogleal, “*Blanket rising*”, *bulking* e espumas filamentosas.

Tabela 4.2- Causas e efeitos de problemas microbiológicos verificados em sistemas de lamas activadas (Adaptado de JENKINS *et al.*, 2004)

Problema	Causa
Crescimento disperso	Os microrganismos estão dispersos, formando apenas pequenos grupos ou células isoladas
<i>bulking</i> zoogleal ou lamas viscosas; <i>bulking</i> não filamentoso	Os microrganismos estão presentes em grandes quantidades de material extracelular. Em casos graves o material extracelular dá uma consistência viscosa ou gelatinosa às lamas activadas
Pequenos flocos (“ <i>pin floc</i> ”)	São formados flocos aproximadamente esféricos, pequenos, compactos. Grandes flocos sedimentam rapidamente e os pequenos sedimentam devagar
“ <i>Blanket rising</i> ”	Desnitrificação no clarificador secundário liberta gás N ₂ que se liga aos flocos de lamas activadas e fá-los flutuar até à superfície.
<i>bulking</i> filamentoso	Grande quantidade de microrganismos filamentosos formando pontes entre flocos ou criando flocos difusos, interferindo com a compactação, sedimentação e espessamento das lamas
Formação de espuma, “ <i>foaming</i> ”	Causada por: tensoactivos não degradados e por Nocardioforms, <i>M. parvicella</i> , ou tipo 1863

4.3.1 CRESCIMENTO DISPERSO E “PIN FLOC”

O crescimento disperso é causado pela ausência ou ruptura das ligações das SPE impedindo a ligação entre os microrganismos. Para se produzir um efluente com baixos SST, este tem de possuir baixos níveis de bactérias individuais e de pequenos agregados celulares. O crescimento suspenso pode dever-se a três condições (JENKINS *et al.*, 2004).

Pode dever-se à selecção de bactérias não formadoras de flocos a elevadas taxas de crescimento. Pode ser causado por uma desigualdade nos catiões, quando a razão entre os catiões monovalentes (Na⁺, K⁺, NH₄⁺) e os divalentes (Ca²⁺ e Mg²⁺) é elevada, pode ocorrer crescimento disperso. Isto porque, os catiões divalentes participam nas ligações de SPE enquanto os monovalentes não (JENKINS *et al.*, 2004).

As duas causas anteriores devem-se a uma biofloculação inadequada e por isso a uma fraca formação de flocos. Porém o crescimento suspenso também se pode dever a quebra ou desfloculação de flocos já existentes. A desfloculação deve-se essencialmente a agentes tensioactivos e materiais tóxicos. A ruptura de ligações devido a cisalhamento mecânico provocado por vigorosos arejamentos, sistemas de queda livre ou canalizações sinuosas dão origem aos chamados “*pin floc*”(JENKINS *et al.*, 2004).

4.3.2 “BLANKET RISING”

Os microrganismos facultativos nos flocos de lamas activadas utilizam nitrato no lugar do oxigénio livre, quando este não está disponível, para a respiração, e libertam azoto como subproduto (RICHARD, 2003). Este gás é ligeiramente solúvel em água e é formado dentro dos flocos e por isso bastante ligado a estes. Este conjunto gás-sólido é mais leve que a água e ascende à superfície. A desnitrificação é um problema mais frequente durante os períodos mais quentes do ano e pode ser mais grave se existirem bactérias filamentosas, devido à maior captura das bolhas de gás (JENKINS *et al.*, 2004, RICHARD, 2003).

Os problemas de desnitrificação podem ser particularmente problemáticos em sistemas de efluentes industriais, onde é adicionada amónia. Aqui, o azoto inorgânico (amónia ou nitrato) deve estar presente para permitir o tratamento adequado e evitar o *bulking* filamentoso, mas deve ser mantido abaixo de cerca de 5 mg / L para evitar problemas de desnitrificação (RICHARD, 2003).

4.3.1 *BULKING* VISCOSO

Este pode ser causado por produção de quantidades excessivas de SPE. Como este é viscoso, pode produzir lamas pouco compactas e pouco sedimentáveis. Jobbagy *et al.*, 2002, constatou que em condições de limitação de nutrientes, e no caso de as lamas activadas não conterem bactérias filamentosas, o índice de volume de lamas aumentava com o aumento do conteúdo em SPE (JENKINS *et al.*, 2004, JOBBAGY *et al.*, 2002) .

As lamas activadas de efluentes domésticos possuem aproximadamente 15 a 20% de carboidratos nos SSV, enquanto que lamas com problemas de *bulking* viscoso chega a 90% (JENKINS *et al.*, 2004).

São conhecidas duas razões para este tipo de *bulking*: i) elevada quantidade de ácidos gordos e oleicos no efluente de água residual e ii) quantidade insuficiente de certos nutrientes como o azoto e fósforo (DIONISI *et al.*, 2006b).

4.3.2 *BACTÉRIAS FILAMENTOSAS*

Embora existam algumas algas filamentosas e fungos filamentosos nos processos de lamas activadas, a maioria dos organismos filamentosos são bactérias. As espécies de bactérias filamentosas predominantes nos sistemas de lamas activadas são: a *Beggiatoa*,

Haliscomenobacter hydrossis, *Microthrix parvicella*, *Nocardioforms*, *Nosticoda limícola*, *Sphaerotilus natans*, *Thiothrix*, Tipo 0041 e Tipo 0092 (GERARDI, 2006).

As bactérias filamentosas podem contribuir positivamente ou negativamente para o desempenho do processo de lamas activadas. Positivamente através da degradação de CBO solúvel, melhoria da formação de flocos e degradação de algumas formas complexas de CBO e negativamente causando problemas de sedimentabilidade, perda de sólidos e produção de espuma (JENKINS *et al.*, 2004).

4.3.2.1 “BULKING SLUDGE”

Os problemas associados às bactérias filamentosas surgem quando o balanço microbiano quebra e há a proliferação deste tipo de bactérias. É somente quando os filamentos crescem em grandes quantidades (aproximadamente 10^7 filamentos por grama de lamas activadas), que se tornam um obstáculo na sedimentação e compactação (RICHARD, 2003).

Dependendo do tipo de filamentos envolvidos, podem ocorrer duas formas de interferência nas lamas: i) ponte de interflocos - onde os filamentos se estendem para lá da superfície dos flocos e vão fisicamente prender outros formando uma rede interligada de vários flocos; e ii) flocos de estrutura aberta - onde os filamentos crescem principalmente dentro do floco e os flocos crescem em torno e anexados aos filamentos. Aqui, os flocos tornam-se grandes, com formas irregulares, e contêm espaços vazios substanciais. O observador mais inexperiente muitas vezes ignora este último tipo de *bulking*. O tipo de interferência existente depende do tipo de organismo filamentoso (JENKINS *et al.*, 2004, RICHARD, 2003).

Apesar de terem sido estudadas as causas da proliferação das bactérias filamentosas em lamas activadas, ainda não é possível tirar conclusões precisas. A Tabela 4.3 sumariza as maiores causas de *bulking* filamentoso reconhecidas actualmente (DIONISI *et al.*, 2006b).

Tabela 4.3 – Resumo das causas de *bulking* filamentoso e respectivo tipo de bactéria (JENKINS *et al.*, 2004).

Causas do <i>bulking</i> filamentoso	Tipo de bactéria filamentosa
Baixa carga orgânica	<i>H. hydrossys</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Thiotrix spp.</i> Tipo 0041, 0675, 0092, 0803, 0914, 1851
Baixo oxigénio dissolvido	Tipo 1701, <i>S. Natans</i> , <i>H. hydrossys</i>
Insuficiência de nutrientes	<i>Thiotrix spp.</i> , Tipo 021N, <i>Nostocoida limicola II</i>
Ácidos gordos na água residual, baixa carga orgânica, baixas temperaturas	<i>Microthrix parvicella</i>

Este problema pode originar perda de lamas no efluente tratado, causando danos ambientais e violações de normas de descarga de efluentes. Em casos graves, a perda de lamas pode levar à perda da capacidade de tratamento e ao fracasso do processo. Além disso, a desinfecção das águas residuais tratadas pode ser comprometida pelo excesso de sólidos presentes. Em casos menos graves, o *bulking* leva ao aumento excessivo das lamas de retorno levando a problemas de eliminação de resíduos de lamas activadas. Muitos problemas de espessamento de lamas residuais são problemas de *bulking* filamentoso (RICHARD, 2003).

4.3.2.2 ESPUMAS, “FOAMING”

Podemos diferenciar três tipos de espumas: espumas devidas ao funcionamento e/ou presença de detergentes, apresentando cor branca, pouco densa e disseminável; espumas originadas pela desnitrificação, provocadas pela ascensão das lamas devido à formação de azoto gasoso; e espumas originadas pelo crescimento excessivo de bactérias filamentosas (JENKINS *et al.*, 2004).

A presença de espumas neste último caso, está intimamente relacionada com a presença de *Nocardioforms* e *Microthrix parvicella* e, mas com menor importância, com o Tipo 1863. As espécies *Nocardioforms* e *M. parvicella* possuem uma superfície celular hidrofóbica, quando crescem em número suficiente elas tornam os flocos hidrofóbicos e passíveis de se aprisionar às bolhas de ar. As bolhas constituídas por agregados de flocos e ar são menos densas que a água e ascendem à superfície onde se acumulam e formam uma espuma densa de cor acastanhada. Ocorre de forma semelhante para os problemas de desnitrificação já vistos acima (JENKINS *et al.*, 2004).

Casos graves de espumas *Nocardioforms* podem causar uma série de problemas operacionais, sendo o principal o que diz respeito à dificuldade de separação eficiente da biomassa do efluente clarificado, reduzindo assim a sua qualidade. Mas existem outros problemas como as condições estéticas, os odores e os riscos de segurança quando as espumas transbordam para cobrir as passagens e corrimãos e problemas físicos das instalações se os tanques de arejamento forem cobertos (RICHARD, 2003).

4.4 REACTOR SBR PARA SELECÇÃO DE CULTURAS MISTAS COM CAPACIDADE DE ACUMULAÇÃO DE PHA

O processo SBR (Sequential Batch Reactor) faz parte da família de tratamentos por lamas activadas. O SBR funciona em descontínuo e por ciclos sequenciais desfasados no tempo onde se criam condições necessárias para o crescimento de microrganismos que realizam a degradação da matéria orgânica (PIRRA, 2005).

O funcionamento do SBR apresenta as seguintes fases sequenciais :

- Alimentação – introdução no reactor de um volume de efluente a tratar;

- Reacção – a mistura efluente e lamas é arejada criando as condições aeróbias necessárias para o crescimento dos microrganismos que efectuem a remoção de matéria orgânica biodegradável;
- Sedimentação – o arejamento é interrompido e, através da acção da gravidade, realiza-se a separação da biomassa do efluente clarificado;
- Descarga – é retirado do reactor um volume de sobrenadante idêntico ao introduzido na alimentação, poderá ser realizada a extracção parcial de lamas produzidas;

O sistema SBR apresenta algumas vantagens face aos reactores contínuos, nomeadamente, a supressão da necessidade de um sedimentador e recirculação de biomassa, visto que a sedimentação é realizada no interior do SBR. A configuração do SBR é facilmente controlável e altamente flexível, permitindo alterações rápidas nas condições operatórias, tais como, a duração dos ciclos e o período de arejamento de forma a alcançar os resultados desejáveis (HU *et al.*, 2005).

Quanto ao funcionamento biológico, este sistema tem o comportamento de um reactor de Lamas Activadas convencional (PIRRA, 2005). A principal vantagem deste sistema é o facto de ser possível controlar o crescimento de bactérias filamentosas, favorecendo a selecção e manutenção da biomassa com boas condições de sedimentabilidade (CHARMOT *et al.*, 1997).

CAPÍTULO 5

OPERAÇÃO DOS REACTORES

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 DESCRIÇÃO DA MONTAGEM EXPERIMENTAL

Para a realização deste trabalho experimental foram utilizados reactores SBR com volume útil de 5L e arejamento uniforme.

Na Figura 5.1 encontra-se uma representação esquemática da instalação laboratorial efectuada e operada durante a realização deste trabalho.

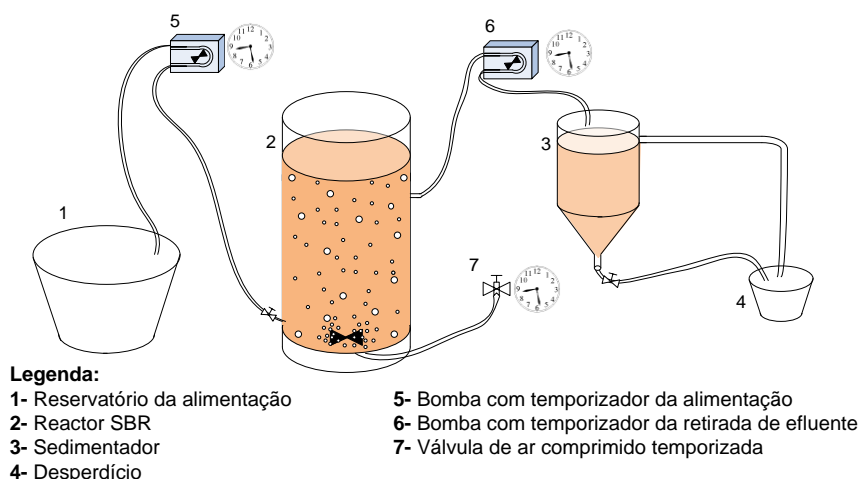


Figura 5.1 – Representação esquemática da instalação laboratorial.

O funcionamento da instalação consistia na alimentação ao reactor através da bombagem (**5** Figura 5.2) do reservatório da alimentação (**1**), para o reactor (**2**) e posterior bombagem (**6**) do efluente do reactor para o sedimentador (**3**). O arejamento do reactor era assegurado por um sistema de difusão com ar proveniente de um compressor e o caudal era controlado por uma válvula de ar comprimido com temporizador.



Figura 5.2 – Imagem da instalação laboratorial operada.

5.1.2 CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DOS REACTORES

Para a realização deste estudo foram operados em simultâneo dois reactores SBR, funcionando cada um em ciclos contínuos de 12h, cujo ciclo de operação está representado na Figura 5.3. Como substrato foram utilizados dois ácidos voláteis, como fonte de carbono, ácidos acético e propiónico, com as seguintes proporções, ácido acético: ácido propiónico de 1:1 e 2:1 em massa.

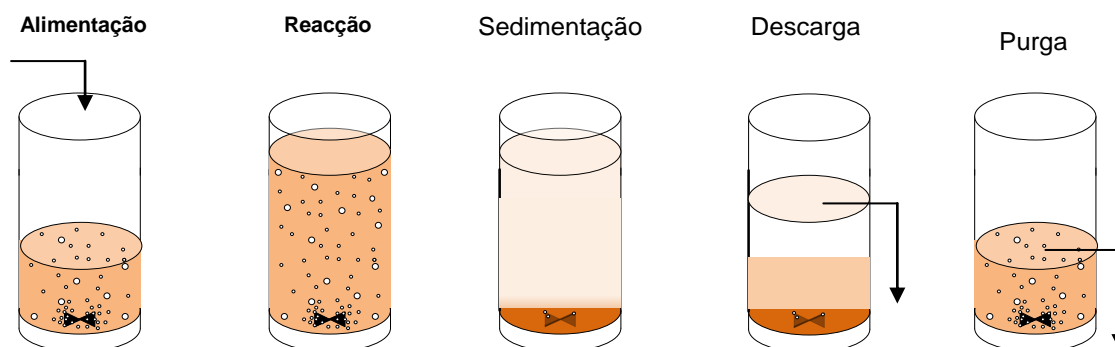


Figura 5.3 – Esquema de um ciclo de operação dos reactores SBR utilizados neste trabalho experimental.

Foi usado como inóculo uma lama biológica proveniente do tanque de lamas activadas da ETAR Sul da SIMRia, localizada próximo da Zona Industrial da Mota, com teor em SST de 4,511g/L e SSV de 4,189g/L. Em ambos os reactores foram adicionados 1,79L de lama biológica, inoculando cada reactor com 1,5 g/L em SSV.

O tempo total do ciclo era de 12h com um tempo de retenção hidráulico (TRH) de 2,5 dias. Cada ciclo consistiu em 11h de aerobiose e 1h de sedimentação (com o arejamento desligado). Nos últimos 20min de sedimentação era efectuada a retirada de 0,75L de sobrenadante. Após o período de sedimentação foi retirado um volume definido de 0,25L de lamas biológicas para manter o tempo de retenção de sólidos (TRS), em 10 dias.

A alimentação era efectuada após a retirada da biomassa, no fim de cada ciclo, fornecendo ao reactor 1L de alimentação. Para além dos ácidos voláteis, a alimentação era ainda constituída por um meio mineral, micronutrientes e macronutrientes (C:N:P) com uma razão de 100:7:1. A informação encontra-se mais detalhada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Constituintes da alimentação fornecida aos reactores (adaptado de DIONISI *et al.*, 2004).

Micronutrientes (mg/L)		Meio mineral (mg/L)	
H ₃ BO ₃	0,3	MgSO ₄ .7H ₂ O	100
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03	EDTA	3
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2	CaCl ₂ .2H ₂ O	50
ZnCl ₂	0,1	(NH ₂) ₂ CS	20
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,05	FeCl ₃ .6H ₂ O	2
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,01	Macronutrientes (mg/L)	
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02	(NH ₂) ₂ CO ou NH ₄ Cl	610 ou 1087
KI	0,03	KH ₂ PO ₄	395

Os micronutrientes são constituídos por ácido bórico, H_3BO_3 , cloreto de manganês tetrahidratado, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, cloreto de cobalto (II) hexahidratado, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, cloreto de zinco, $ZnCl_2$, molibdato de amónio tetrahidratado, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, cloreto de cobre dihidratado, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, cloreto de níquel hexahidratado, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ e iodeto de potássio, KI, como fonte de boro, manganésio, cobalto, zinco, molibdénio, cobre, níquel e potássio, respectivamente.

O meio mineral é constituído pela tioureia, $(NH_2)_2CS$, adicionada para inibir a nitrificação; o EDTA com função quelante, forma complexos estáveis com iões metálicos como o cálcio e o ferro; o cloreto de cálcio dihidratado, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, o cloreto férrico (III) hexahidratado, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e o sulfato de magnésio heptahidratado, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, como fonte de cálcio, ferro e magnésio, respectivamente.

No respeitante aos macronutrientes o cloreto de amónio, NH_4Cl , é adicionado como fonte de azoto e o dihidrogenofosfato de potássio, KH_2PO_4 , como fonte de fósforo.

No segundo ensaio foi alterada a fonte de azoto: a ureia $(NH_2)_2CO$ foi substituída por cloreto de amónio, NH_4Cl , com uma concentração de 1087 mg/L.

A função de cada um dos elementos adicionados, descritos acima, encontra-se detalhada no anexo A.

O pH do reactor foi ajustado, com HCL 37%, para valores inferiores a 9, na ordem de 8,7, sempre que era efectuada uma nova alimentação. O pH da alimentação foi ajustado com NaOH 3,5N, para os valores referidos na Tabela 5.2.

Para a realização deste trabalho prático foram tidos em atenção alguns dados de trabalhos experimentais já efectuados anteriormente. Tendo assim como base as experiências já efectuadas, foi escolhido, para esta tese de mestrado, o conjunto de condições de operação dos reactores atrás referidas com o estudo de variações de carga e substrato presentes na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Quadro resumo das condições de operação de reactores estudada ao longo deste trabalho.

Ensaio		Condições de operação	Carga (gCQO.L ⁻¹)	Substrato HAc:HPr	Fonte de azoto	pH alimentação
1 37 dias	R1	TRS= 10d TRH= 2,5d Tempo de ciclo=12h C:N:P = 100:7:1 Controlo do TRS	2	1:1	Ureia	6
	R2		2	2:1		
2 38 dias	R3		4	1:1	Cloreto de amónio	5,5
	R4		4	2:1		
3 14 dias	R5		8	1:1		
	R6		8	2:1		

5.1.3 MONITORIZAÇÃO DA OPERAÇÃO DOS REACTORES

É efectuada a monitorização dos reactores através da realização de análises referentes aos Sólidos, CQO e pH da alimentação e do reactor. A monitorização destes parâmetros foi efectuada bissemanalmente. Para os cálculos destes parâmetros foram efectuadas

três réplicas da amostra, sendo posteriormente analisados os dados e considerada a média.

Foram também monitorizados os ácidos orgânicos voláteis (AOV's), tendo estes sido quantificados sempre que se considerou necessário.

5.1.3.1 SÓLIDOS

Foram analisados os sólidos suspensos totais e os sólidos suspensos voláteis. Os sólidos suspensos totais correspondem à matéria orgânica e inorgânica em suspensão na amostra. Os sólidos voláteis são em geral considerados matéria orgânica, apesar de alguma matéria orgânica não volatilizar e se verificar também a volatilização, decomposição (carbonatos, sulfatos ou nitratos) ou oxidação (ferro ou magnésio) de alguns sais minerais a altas temperaturas.

Para a determinação dos sólidos suspensos totais e dos sólidos suspensos voláteis foram adaptados os métodos descritos no protocolo 2540 B e E, respectivamente, do manual Standard Methods ((APHA), 1998).

No método utilizado foram inicialmente calcinados cadinhos com filtro durante 20min numa mufla a 550°C, Figura 5.4 B, sendo guardados posteriormente num excicador para arrefecimento. A filtração foi efectuada a partir de um volume conhecido, utilizando filtros (marca Reeve Angel, grade 403) previamente calcinados e pesados ($m_{\text{cadinho+filtro}}$) (balança Precisa XB 120^a: Max. 120g; min. 0,01g, d=0,0001; e= 0,001g). Para o cálculo dos SST os filtros com sólidos foram colocados numa estufa, Figura 5.4 A, durante aproximadamente 24h a 105°C. Após arrefecimento e pesagem ($m_{\text{cadinho+filtro+amostra seca}}$), os filtros com os sólidos são colocados na mufla durante 2h a 550°C, sendo posteriormente colocados num excicador a arrefecer até à temperatura ambiente para serem posteriormente pesados ($m_{\text{cadinho+filtro+amostra calcinada}}$).



Figura 5.4 – Equipamento utilizado para a determinação dos sólidos: a) estufa; b) mufla.

Os cálculos para a determinação dos SST e SSV foram efectuados de acordo com as fórmulas seguintes:

$$SST (mg.L^{-1}) = \frac{m_{cadinho+filtro+amostra\ seca\ (mg)} - m_{cadinho+filtro\ (mg)}}{V_{amostra}(L)}$$

$$SSV (mg.L^{-1}) = \frac{m_{cadinho+filtro+amostra\ calcinada\ (mg)} - m_{cadinho+filtro+amostra\ seca\ (mg)}}{V_{amostra}(L)}$$

- Interferências e limitações do método

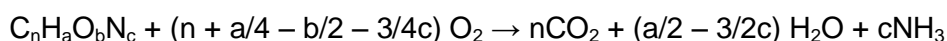
A determinação dos SST tem algumas condicionantes que podem ser tidas em conta:

1. A medição dos valores de SST é dependente do tipo e tamanho dos poros do filtro utilizado;
2. Autofiltração, ou seja, dependendo do volume de amostra filtrado, os sólidos retidos pelo filtro podem também contribuir para a retenção de sólidos;
3. Dependendo das características da matéria particulada, as partículas pequenas podem ser removidas por absorção ao material já retido no filtro;
4. São excluídas grandes partículas flutuantes ou aglomerados de materiais não homogêneos se for determinado que estes não devem ser incluídos nos resultados finais, isto deve-se, também, ao facto de que o resíduo em excesso no filtro pode colmatá-lo.

Na determinação dos SSV pode ter-se em consideração que podem ocorrer erros devido à perda de material volátil durante a secagem e ainda o erro considerável que pode resultar da determinação de baixas concentrações de sólidos voláteis na presença de grandes quantidades de sólidos fixos.

5.1.3.2 CARÊNCIA QUÍMICA DE OXIGÉNIO (CQO)

O teste da carência química de oxigénio corresponde à quantidade de oxigénio necessária para oxidar quimicamente a matéria orgânica inerte e matéria biologicamente oxidável presente na água. A reacção dá-se de acordo com a seguinte equação:



O teste baseia-se no facto de que todos os compostos orgânicos, com algumas excepções (piridina e os hidrocarbonetos aromáticos, resistentes à oxidação), podem ser oxidados pela acção de agentes oxidantes fortes em condições ácidas. A oxidação da maior parte dos compostos orgânicos é de cerca de 95 a 100% do valor teórico ((APHA), 1998).

Para o estudo deste parâmetro foi adaptado o método colorimétrico de refluxo fechado descrito no protocolo 5220 D do manual Standard Methods ((APHA), 1998).

Para a análise da CQO foram preparados tubos de digestão (de vidro com tampas revestidas a TFE e lavados em ácido comercial a 20%) contendo 1,5ml de dicromato de potássio como oxidante (possuindo elevada capacidade de oxidação, aplicabilidade a uma larga variedade de amostras e facilidade de manipulação) e 2,5ml de uma solução de ácido sulfúrico (proporcionando condições ácidas), sulfato de prata (oxidando ácidos de cadeia longa e álcoois) e sulfato de magnésio (eliminando a interferência dos cloretos). A esta preparação foi adicionado 2,5ml de amostra previamente filtrada (filtros marca Reeve Angel, grade 403) para determinação do CQO solúvel.

Os tubos com a amostra foram posteriormente colocados a digerir a 150°C durante 2h numa câmara de digestão específica (Aqualytic AL38). Após a digestão e arrefecimento até a temperatura ambiente foi determinada a concentração de oxigénio, utilizando um espectrofotómetro (marca Aqualytic, modelo PC023212), Figura 5.5.



Figura 5.5 – Espectrofotómetro utilizado para determinação da CQO.

- Interferências e limitações do método

A limitação mais importante é a incapacidade de distinguir entre a matéria orgânica biologicamente oxidável e a biologicamente inerte.

A interferência mais comum é a do ião cloreto. O cloreto reage com o ião de prata para precipitar cloreto de prata, inibindo assim a actividade catalítica da prata. Brometo, iodeto e qualquer outro reagente que inactive o ião prata interfere de modo semelhante.

Resíduos que possuam concentrações de metais que produzem colorações que absorvam na gama de análise, inviabilizam a utilização do método colorimétrico

5.1.3.3 pH

A análise de pH foi efectuada com um eléctrodo de pH (Consort C535) calibrado com soluções-tampão de pH 4 e 7 (Panreac).

5.1.3.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (AOV's)

O teor em AOV's foi determinado recorrendo à cromatografia gás-líquido, utilizando um cromatógrafo de gás Chrompack modelo CP9001, com detector de ionização de chama e com as características de operação apresentadas na Tabela 5.3 (FID, *Flame Ionization Detector*).

Tabela 5.3 – Características de operação do cromatógrafo gás-líquido.

Parâmetros		Características
Volume de amostra		0,5 µL
Gases	Tipo	Hélio (gás de arraste)
	Caudal	8 mL/min
Coluna		Coluna CP-sil5-CB (25m x 0,53mm x 5µm)
Temperatura	Coluna	290°C
	Injecção	270°C
	Detector	300°C
Tempo de corrida		12,70 min
Software de integração		Jasco-Boewin (1998), versão 1.50



Figura 5.6 - Cromatógrafo utilizado na análise dos AOV's.

Para análise dos AOV's as amostras foram previamente filtradas, acidificadas com ácido fórmico (1:10 v/v) e colocados em frascos de polietileno e refrigeradas, até serem analisadas.

Para esta análise foram efectuados padrões mistos de concentração conhecida para calibração do aparelho, tendo sido adicionado ácido fórmico na proporção de 1:10 (v/v), para garantir iguais condições às matrizes das amostras e poder fazer-se a comparação.

Após calibração era efectuada a análise que resultava na obtenção de um cromatograma onde se podia identificar e quantificar a composição de sete ácidos orgânicos voláteis (acético, propiónico, iso-butírico, n-butírico, isovalérico, n-valérico e n-capríco).

Através da área de pico e das rectas de calibração era possível retirar o valor de concentração de cada AOV existente na amostra.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA OPERAÇÃO DOS REACTORES

Foram operados dois reactores aeróbios, SBR, durante 96 dias, de acordo com as condições experimentais descritas anteriormente. Os resultados obtidos através da monitorização destes reactores são apresentados abaixo graficamente. A análise dos vários parâmetros é efectuada primariamente pelo efeito das várias cargas experimentais, 2, 4 e 8 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ e posteriormente pelo efeito das duas concentrações de ácido acético e ácido propiónico utilizadas, 1:1 e 2:1. Os parâmetros analisados graficamente são os SS, a CQO e os AOV's. É também analisada graficamente a evolução do CQO ao longo de um ciclo de operação para as cargas de 2 e 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ assim como a evolução dos AOV's ao longo de um ciclo de operação para a carga 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹.

Ao longo deste trabalho experimental foram efectuadas as seguintes alterações ao procedimento experimental de modo a melhorar o funcionamento dos reactores:

- Retirada da ureia como fonte de azoto no dia de operação 59 e sua substituição por cloreto de amónio (dia 62 de operação) devido à existência de CQO residual, como iremos analisar posteriormente.
- Substituição das lamas do reactor de proporção ácido acético e ácido propiónico 1:1 pelas lamas do reactor 2:1, no dia de operação 72, com base nas análises efectuadas a parâmetros físicos e microbiológicos.
- Considerar um período de transição de 3 dias em ambos os reactores, com a passagem da carga 4 para 6 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, dia de operação 78 e posteriormente para 8 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, dia 83 de operação, de forma a diminuir o choque de carga na ultima condição de operação.

5.2.1 EVOLUÇÃO TEMPORAL DOS SÓLIDOS SUSPENSOS

A monitorização efectuada ao funcionamento dos reactores permitiu-nos obter a resposta dos microrganismos às variações da carga orgânica a eles imposta. Esta evolução está representada nos gráficos das Figuras 5.7 e 5.8.

Pela análise dos valores obtidos e das Figuras 5.7 e 5.8 verifica-se que os SSV correspondem em média a 86% dos SST.

5.2.1.1 PROPORÇÃO ÁCIDO ACÉTICO: ÁCIDO PROPIONICO 1:1

Através da análise da Figura 5.7 verificamos que os primeiros 26 dias, equivalendo à carga 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, corresponderam ao período inicial de adaptação dos microrganismos a estas condições tendo-se verificado a manutenção da concentração de SST e SSV aproximadamente constante, por volta de 1,7 g.L⁻¹ e 1,5 g.L⁻¹, respectivamente. Após a adaptação a estas condições, entre o dia de operação 26 e o

dia 33, houve um crescimento dos sólidos biológicos de cerca de $1,613 \text{ g.L}^{-1}$ para $3,240 \text{ g.L}^{-1}$ em SSV.

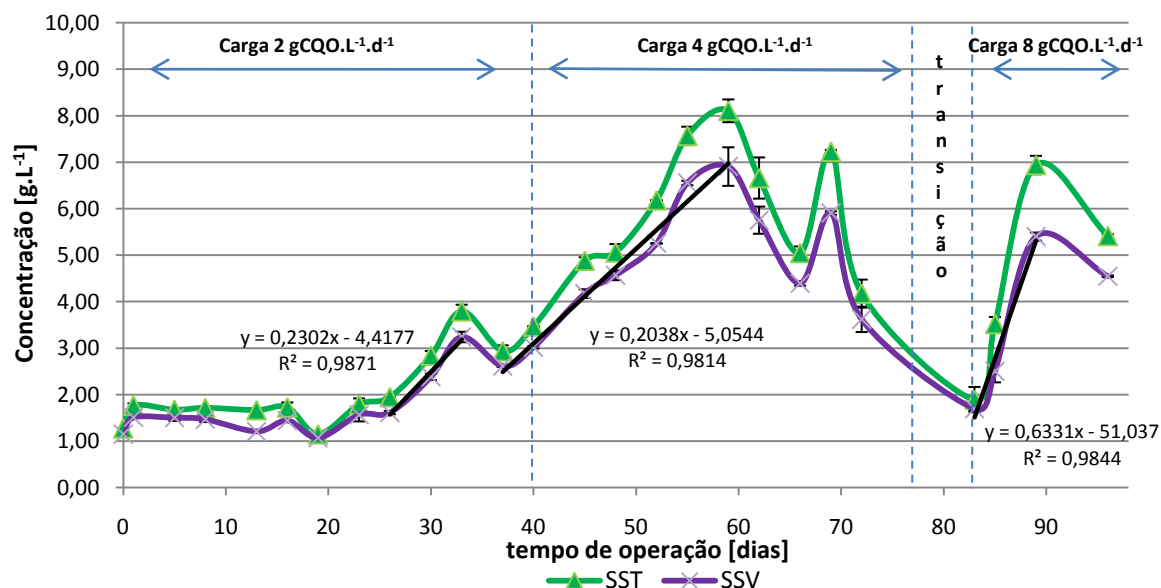


Figura 5.7 – Evolução dos SST e SSV durante o tempo de operação para o reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico.

O aumento da carga para $4 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ no dia de operação 40 resultou num rápido crescimento dos sólidos biológicos até ao dia 59 de operação do reactor. Este crescimento traduz-se numa passagem de $3,020 \text{ g.L}^{-1}$ para $6,907 \text{ g.L}^{-1}$ em SSV.

No dia de operação 59 procedeu-se à retirada da ureia na alimentação (fonte de azoto) fornecida aos microrganismos, o que resultou num decréscimo abrupto dos SSV para o dia de operação 62 (de $6,907 \text{ g.L}^{-1}$ para $5,753 \text{ g.L}^{-1}$, dia 59 e 62, respectivamente). No dia de operação 62 foi novamente fornecido azoto, utilizando agora cloreto de amónio em substituição da ureia. A razão desta alteração encontra-se desenvolvida mais à frente. No dia de operação 69 os microrganismos já se encontravam a responder favoravelmente à nova fonte de azoto tendo havido um aumento de SSV (de $4,393$ para $5,907 \text{ g.L}^{-1}$, dia de operação 66 e 69, respectivamente).

No dia de operação 72, foi efectuada a substituição das lammas deste reactor, por um inóculo de lammas biológicas do reactor HAC:HPr, 2:1, tendo-se iniciado a operação com $1,693$ e $1,867 \text{ g.L}^{-1}$ em SSV para os reactores HAC:HPr, 1:1 e 2:1, respectivamente. A causa desta substituição teve em conta as análises físicas efectuadas durante o controlo do ciclo, ponto 5.2.3 desta tese, e as análises microbiológicas, capítulo 6.

Para não causar um choque de carga muito elevado, de 4 para $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, foi efectuado um período de transição de 3 dias, de início no dia de operação 78, com uma carga intermédia de $6 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. A carga foi elevada para $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ no dia 83 de operação verificando-se um crescimento muito rápido de $1,693 \text{ g.L}^{-1}$ SSV, e $1,893 \text{ g.L}^{-1}$ SST, para $5,400$ e $6,940 \text{ g.L}^{-1}$ em SSV e SST, respectivamente, no dia 89 de operação.

No dia 96 de operação houve uma queda do crescimento para $4,547 \text{ g.L}^{-1}$ em SSV à semelhança do ocorrido para o reactor HAC:HPr, 2:1, Figura 5.8, onde se verificou um

decréscimo ainda mais acentuado para $4,444 \text{ g.L}^{-1}$ em SSV. Através do controlo microbiológico efectuado no decorrer da operação dos reactores foi verificado o aparecimento de um problema discutido no capítulo 6 desta tese.

5.2.1.2 PROPORÇÃO ÁCIDO ACÉTICO: ÁCIDO PROPIÓNICO 2:1

Analisando para a carga de $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, Figura 5.8, verificamos uma resposta mais rápida dos microrganismos às novas condições do que a verificada para o reactor HAc:HPr, 1:1. A partir do dia 5 de operação houve início do crescimento dos microrganismos embora com crescimento não muito elevado possivelmente devido à adaptação às condições impostas e à carga baixa. Os SSV passaram de $1,560 \text{ g.L}^{-1}$, dia 5 de operação, para $2,453 \text{ g.L}^{-1}$ no dia 16 de operação.

Apesar de os sólidos biológicos terem sofrido uma pequena descida nos dias de operação 19 e 23 ($2,153$ e $2,187 \text{ g.L}^{-1}$ em SSV, respectivamente), foi verificado que estes se mantiveram a valores aproximadamente constantes, média de $2,4 \text{ g.L}^{-1}$ SSV, até ao dia de alteração de carga.

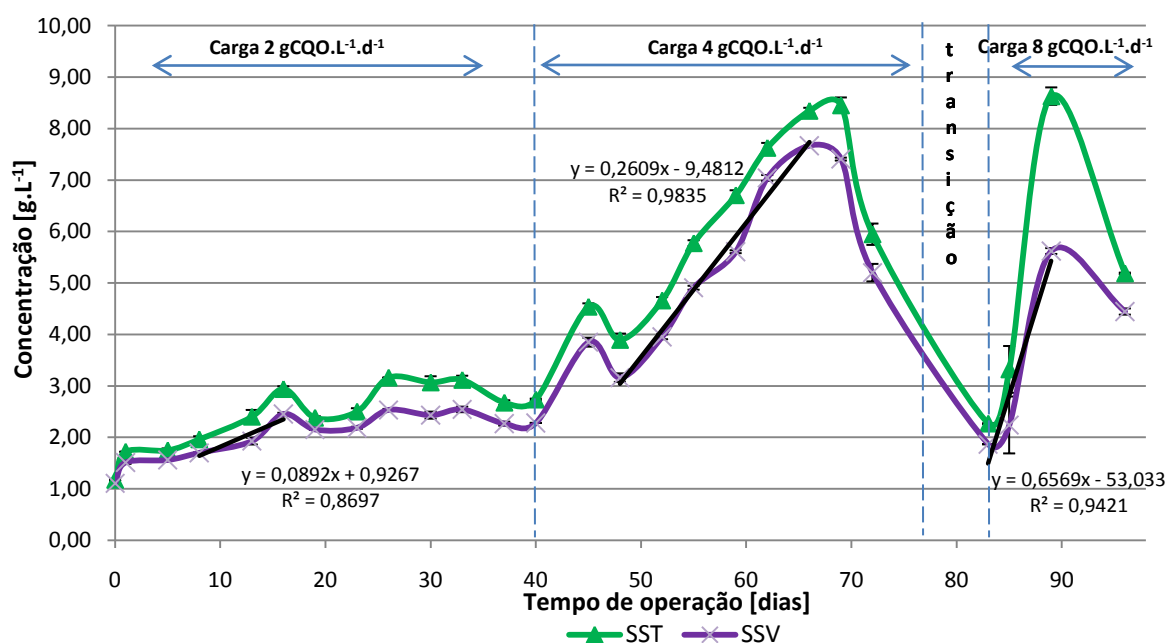


Figura 5.8 - Evolução dos SST e SSV durante o tempo de operação para o reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1.

Para a carga de $4 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ com início no dia 40 de operação do reactor verificou-se uma resposta muito boa dos microrganismos com um bom crescimento até ao dia 69 de operação, passando de $2,280 \text{ g.L}^{-1}$, dia de operação 40, para $7,407 \text{ g.L}^{-1}$, dia de operação 69, em SSV.

No dia 72 foi retirado deste reactor 1L de lamas biológicas para inocular o reactor HAc:HPr 1:1, verificando-se um decréscimo nos SSV para $5,200 \text{ g.L}^{-1}$.

À semelhança do reactor de proporção HAc:HPr, 1:1 também este reactor foi submetido a uma carga de transição de $6 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ no dia de operação 78, iniciando a carga de $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ também no dia 83 de operação.

Para a nova carga imposta verificou-se um aumento muito elevado do crescimento passando de $1,867 \text{ g.L}^{-1}$, no dia 83, para $5,620 \text{ g.L}^{-1}$, no dia 89, em SSV.

5.2.2 EVOLUÇÃO TEMPORAL DA PERCENTAGEM DE REMOÇÃO EM FUNÇÃO DA CARGA ORGÂNICA

A eficiência de remoção do CQO solúvel em função da carga orgânica está apresentada nos gráficos das Figuras 5.9 e 5.10.

5.2.2.1 PROPORÇÃO ÁCIDO ACÉTICO: ÁCIDO PROPIONICO 1:1

Analisando o gráfico da Figura 5.9 em termos de remoção de CQO solúvel é possível dizer que praticamente não houve grandes variações em função da carga orgânica. Em termos de percentagem de remoção de CQO desde o dia 33 até ao último dia de operação do reactor verifica-se um valor de remoção muito bom quase sempre superior a 95%, indicando um bom funcionamento do reactor em termos de remoção de matéria orgânica.

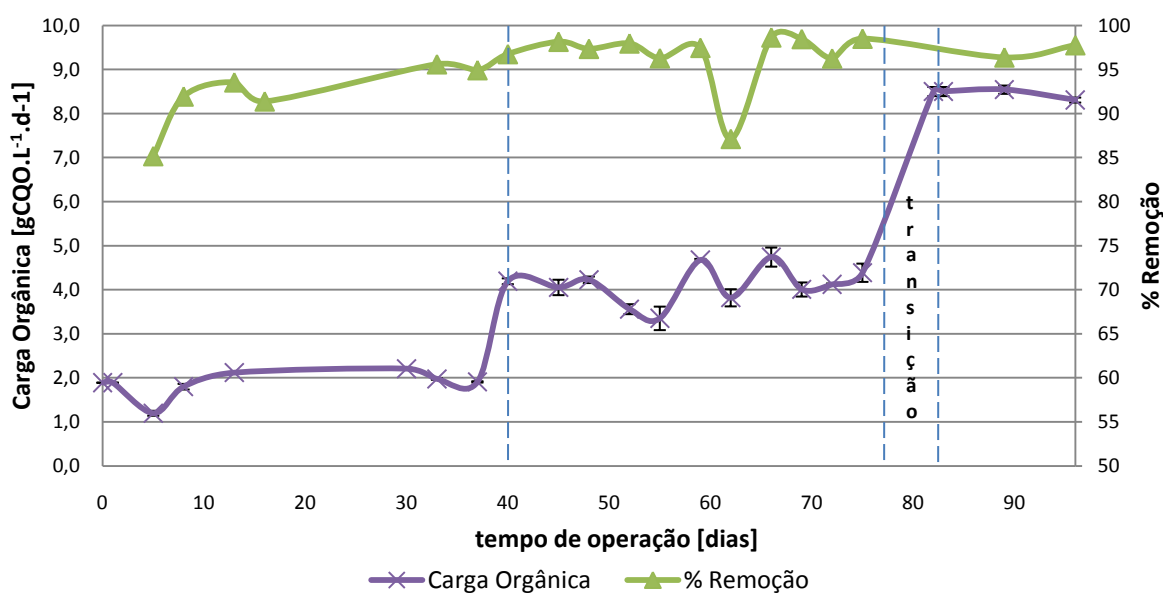


Figura 5.9 – Variação da percentagem de remoção ao longo do tempo de operação e em função da carga orgânica para o reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico.

Os valores mais baixos em termos de remoção de CQO solúvel verificaram-se no início da operação do reactor que correspondeu ao período de adaptação dos microrganismos, tendo o mínimo de percentagem de remoção sido atingido no dia 5 com 85,4%. O pico inferior no dia 62, de 87,10%, correspondeu ao período de substituição da ureia por cloreto de amónio como fonte de azoto.

Em termos da variação da carga verifica-se algumas oscilações em torno dos valores 2, 4 e 8 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ resultantes possivelmente de erros sistemáticos e aleatórios no decorrer do trabalho laboratorial.

5.2.2.2 PROPORÇÃO ÁCIDO ACÉTICO: ÁCIDO PROPIONICO 2:1

À semelhança do reactor com igual proporção de ácidos também este reactor apresentou um comportamento sem variação da percentagem de remoção com a variação da carga, Figura 5.10, mantendo sempre uma percentagem de remoção superior a 95% até ao dia de operação 75, à excepção do dia 8 (92,27%) quando ainda estava em adaptação.

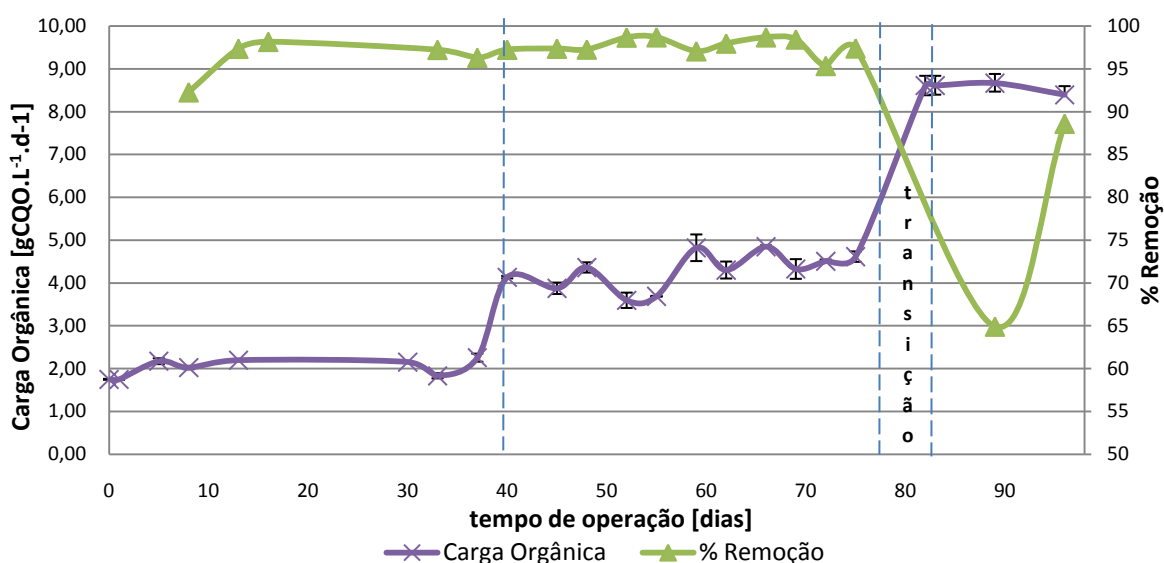


Figura 5.10 - Variação da percentagem de remoção ao longo do tempo de operação e em função da carga orgânica para o reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1.

Com a alteração da carga para 8 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ verifica-se um decréscimo acentuado da eficiência de remoção, dia 89 de operação, com posterior recuperação para 88,6% no dia 98 de operação. Porém como foram efectuadas poucas análises não se pode retirar conclusões acerca do funcionamento do reactor neste período de tempo.

5.2.3 ANÁLISE AOS AOV'S

A presença de CQO residual em ambos os reactores para a carga de $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ levou à monitorização dos AOV's para verificar qual a fracção, dos ácidos que estavam a ser alimentados (ácidos acético e propiónico), que correspondia ao CQO residual existente na fase de "fome". Desta forma foram efectuadas análises aos AOV's nos dias 40, 48, 59 e 62.

5.2.3.1 PROPORÇÃO ÁCIDO ACÉTICO: ÁCIDO PROPIONICO 1:1

Através da análise dos AOV's, para o dia 40 de operação, obtivemos os seguintes valores: ácido acético $82,3 \text{ mg CQO.L}^{-1}$, ácido propiónico $28,7 \text{ mg CQO.L}^{-1}$, não existindo presença de mais nenhum ácido dos 7 analisados, perfazendo um total de $111,0 \text{ mg CQO.L}^{-1}$, Figura 5.11 A. Este valor encontra-se muito abaixo do valor de CQO residual analisado para esse mesmo dia, $251,0 \text{ mg CQO.L}^{-1}$, o que corresponde a 44% de AOV's, Figura 5.11 B, indicando que existe outra fonte ou causa para o CQO residual observado. Foi repetida a análise no dia 48 de operação, tendo-se obtido novamente valores para os AOV's (total de ácido AOV's de $108,0 \text{ mg CQO.L}^{-1}$, ácido acético $82,4 \text{ mgCQO.L}^{-1}$ e ácido propiónico $25,5 \text{ mgCQO.L}^{-1}$) inferiores ao valor de CQO residual obtido através da análise ao reactor ($194,5 \text{ mg CQO.L}^{-1}$), com 55% de AOV's no CQO residual.

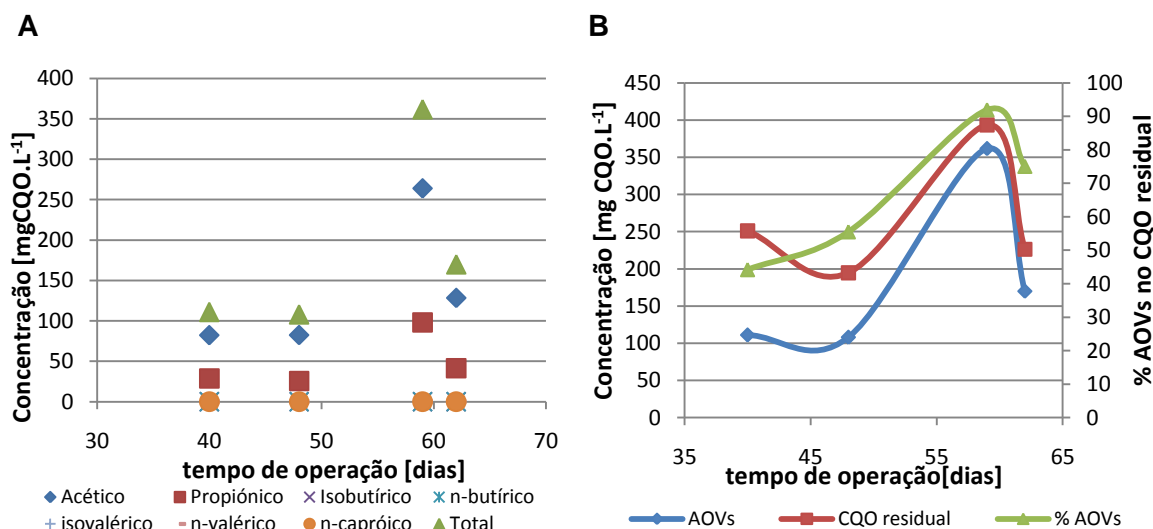


Figura 5.11 – A - Caracterização dos AOV's presentes no reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico. **B** - Concentração dos AOV's e CQO residual em função da percentagem de ácidos existente em solução na fase de "fome".

Foi então actuado sobre outra possível causa para o CQO residual. A ureia, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, ao ser utilizada como fonte de azoto poderia estar a fornecer também carbono ao meio fazendo com que possivelmente os microrganismos utilizassem este carbono em vez do carbono proveniente dos ácidos. Para analisar este parâmetro foi substituída a ureia pelo cloreto de amónio, NH_4Cl , no final da operação a carga $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Foram medidos os AOV's novamente para os dias 59 e 62, Figura 5.11, ou seja, antes e depois de se efectuar a mudança da fonte de azoto para verificar se ocorreu alguma alteração.

Para o dia 59 ocorreu um aumento dos AOV's presentes nas lamas biológicas com um valor total de $361,8 \text{ mgCQO.L}^{-1}$ (ácido acético $263,9 \text{ mgCQO.L}^{-1}$ e ácido propiónico $97,9 \text{ mgCQO.L}^{-1}$, Figura 5.11 A), obtendo-se um valor de percentagem de AOV's no CQO residual de 92%. No dia 62 em relação às análises de AOV's efectuadas anteriormente verificou-se uma diminuição dos AOV's em relação ao dia de operação 59. Obteve-se valores totais de ácidos, $169,9 \text{ mgCQO.L}^{-1}$ (ácido acético $128,4 \text{ mgCQO.L}^{-1}$ e ácido propiónico $41,5 \text{ mgCQO.L}^{-1}$, Figura 5.11 A), continuaram inferiores ao CQO medido no reactor $226,3 \text{ mgCQO.L}^{-1}$, figura 5.11 B, percentagem de AOV's no CQO residual de 75%. Neste dia, de acordo com a análise efectuada aos sólidos suspensos, ainda não estavam reunidas as condições de estabilização por parte dos microrganismos, tal só se verificou no dia de operação 66. No dia 69 foram novamente monitorizados os AOV's, ponto 5.2.4.2 desta tese, obtendo-se para este dia uma percentagem de AOV's no CQO residual de 76%.

5.2.3.2 PROPORÇÃO ÁCIDO ACÉTICO: ÁCIDO PROPIONICO 2:1

À semelhança do que foi efectuado para o reactor HAc:HPr, 1:1, também para este reactor HAc:HPr, 2:1 foram efectuadas análises aos AOV's, Figura 5.12, devido ao CQO residual verificado no controlo de ciclo analisado no ponto 5.2.4.2 deste trabalho. Analisando os valores de AOV's para os dias de operação 40 e 48, verificamos valores totais de AOV's de $123,1 \text{ mg CQO.L}^{-1}$ (ácido acético $81,3 \text{ mgCQO.L}^{-1}$ e ácido propiónico $41,9 \text{ mgCQO.L}^{-1}$) e $187,6 \text{ mg CQO.L}^{-1}$ (ácido acético $114,5 \text{ mgCQO.L}^{-1}$ e ácido propiónico $73,1 \text{ mgCQO.L}^{-1}$), respectivamente. Os valores de CQO para estes dois dias de operação são superiores ($169,0$ e $272,0 \text{ mg CQO.L}^{-1}$, dia 40 e 48 de operação, respectivamente), traduzindo-se numa percentagem de ácidos de 73% e 69%, valores superiores aos verificados para o reactor HAc:HPr, 1:1.

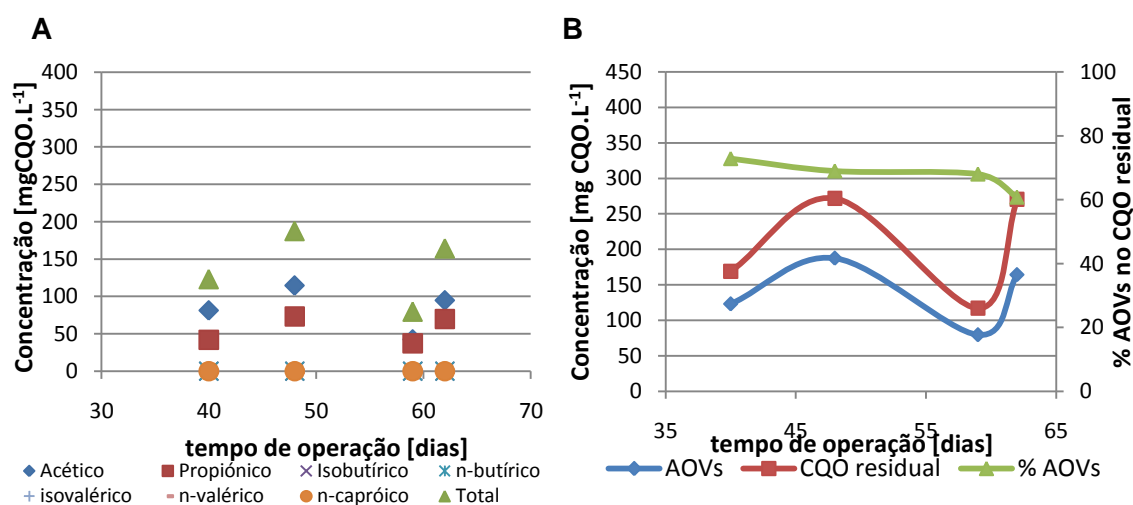


Figura 5.12 – A Evolução dos AOV's no decorrer de um ciclo de operação, com carga orgânica de $4 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1. **B** Concentração dos

AOV's e CQO residual em função da percentagem de ácidos existente em solução na fase de "fome".

De forma semelhante a alteração da ureia por cloreto de amónio não veio a revelar alterações significativas a nível de CQO residual e AOV's. Analisando os valores de AOV's obtidos para o dia 59, 79,6 mgCQO.L⁻¹ (ácido acético 42,5 mgCQO.L⁻¹ e ácido propiónico 37,1 mgCQO.L⁻¹), com o valor obtido para o dia 62, 164,3 mgCQO.L⁻¹ (ácido acético 94,7mgCQO.L⁻¹ e ácido propiónico 69,6 mgCQO.L⁻¹), verificamos que apesar de o valor de AOV para o dia 62 se mostrar bastante superior podendo indicar uma mudança devido à alteração da fonte de carbono. Analisando o CQO de saída para estes dois dias temos que o valor para o dia 62, 270,5 mgCQO.L⁻¹ é também mais de o dobro do obtido para o dia 59, 117,0 mgCQO.L⁻¹, traduzindo-se em valores aproximados de percentagem de AOV's no CQO residual, 68% e 61% para os dias 59 e 62 de operação.

5.2.4 FUNCIONAMENTO DURANTE OS CICLOS

5.2.4.1 CARGA 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹

Para os dois reactores com proporções de HAc:HP, de 1:1 e 2:1, foi efectuada, no dia de operação 26, a monitorização de CQO e pH de hora a hora, durante o ciclo de 12h. Os resultados estão representados nas Figuras 5.13 e 5.14.

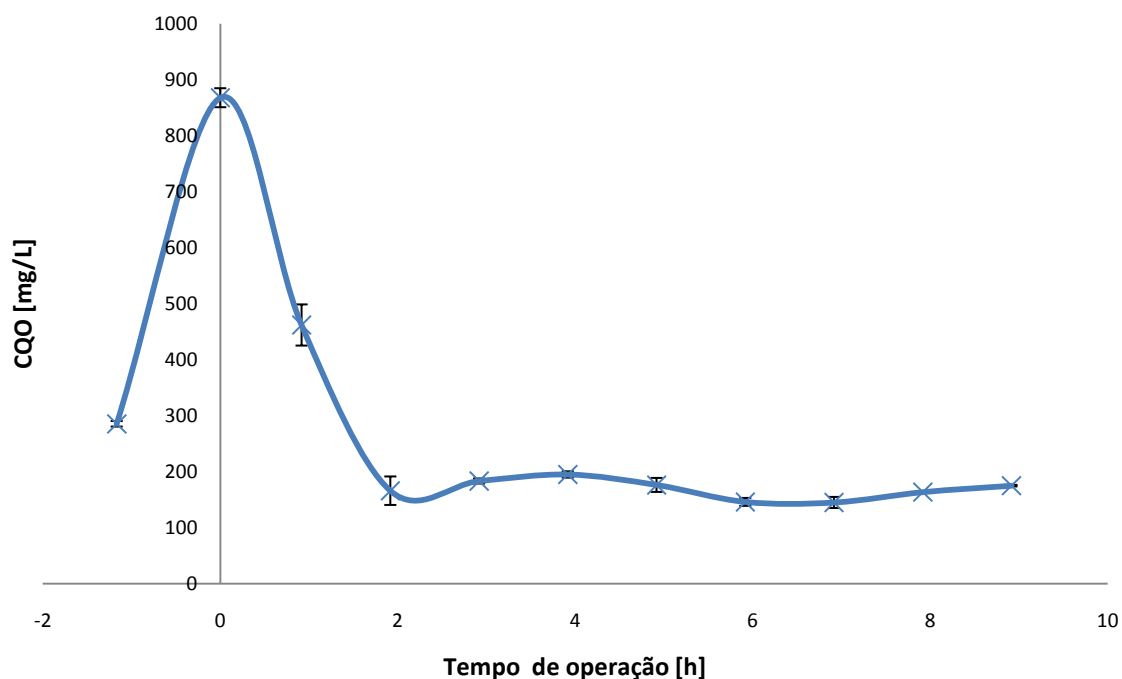


Figura 5.13 – Evolução da CQO no decorrer do controlo de um ciclo, com carga orgânica de 2gCQO.L⁻¹.d⁻¹ e reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico.

Comparando os reactores HAc:HPr 1:1, Figura 5.13, e HAc:HPr 2:1, Figura 5.14, verificamos uma resposta mais rápida para o reactor HAc:HPr 2:1, tendo-se iniciado a fase de fome após aproximadamente 1h de se ter fornecido a alimentação enquanto que para o reactor HAc:HPr 1:1, demorou cerca de 2h a ser iniciada.

Através da análise do primeiro controlo de ciclo foi possível identificar a existência de um CQO residual de aproximadamente 180mg.L^{-1} que não era consumido mesmo ao fim da fase de “fome”. Este valor manteve-se também para os resultados obtidos para o reactor com proporção HAc:HPr de 2:1. No dia 40 de operação foram monitorizados os AOV's, Figura 5.11.

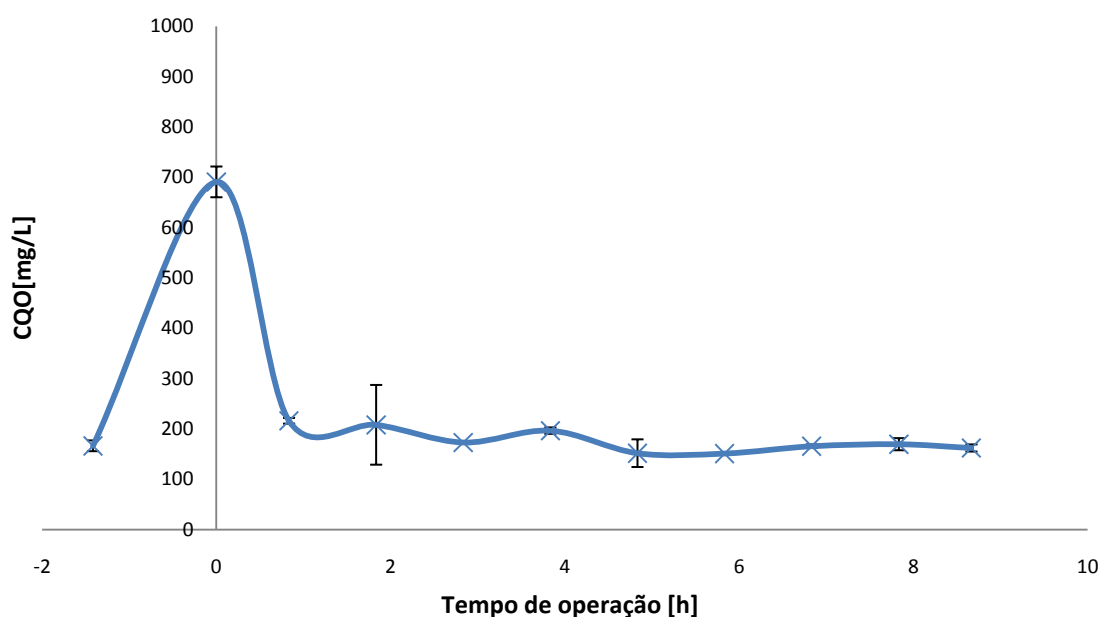


Figura 5.14 - Evolução da CQO no decorrer do controlo de um ciclo, com carga orgânica de $2\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1.

Apesar de se ter corrigido o pH para valores inferiores a 9 em ambos os reactores, 8,8 e 8,9 para o reactor HAc:HPr, 1:1, e HAc:HPr, 2:1, respectivamente, verificamos que ambos possuem a tendência para elevar o seu pH, em 1 ciclo de operação, tendo-se verificado valores próximos de 9,4, HAc:HPr, 1:1, e 9,5, HAc:HPr, 2:1, Figura 5.15.

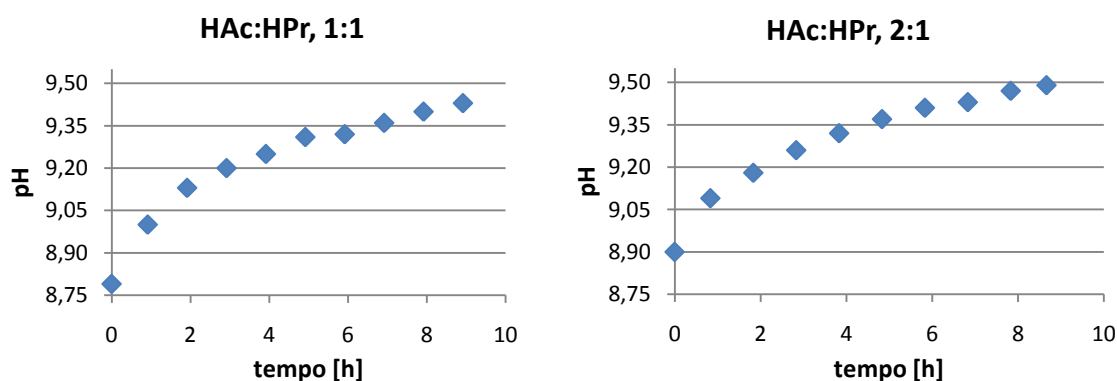


Figura 5.15 – Evolução do pH no decorrer do controlo de um ciclo, com carga orgânica de $2\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 1:1 e 2:1.

5.2.4.2 CARGA 4gCQO.L⁻¹.d⁻¹

O ciclo de 12h para a carga de 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, proporções HAc:HPr, 1:1, foi monitorizado no dia de operação 69, o CQO, o pH e os AOV's. Os resultados encontram-se a seguir, Figuras 4.16 a 4.20.

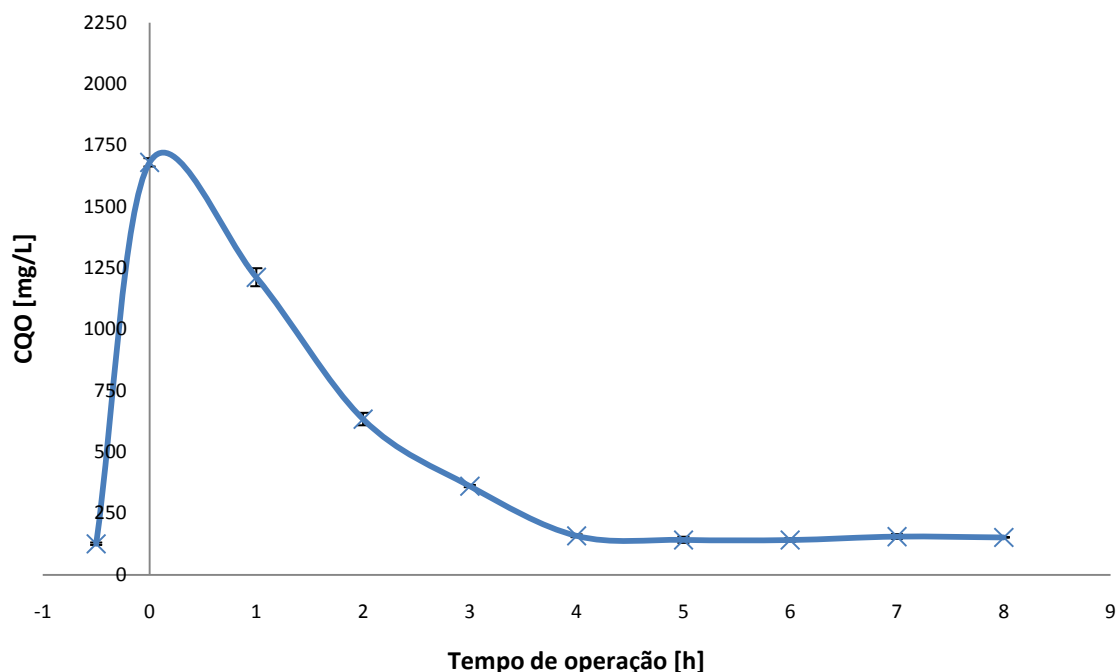


Figura 5.16 - Evolução da CQO no decorrer de um ciclo de operação, com carga orgânica de 4gCQO.L⁻¹.d⁻¹ e reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico.

A análise aos AOV's efectuada no dia de operação 69, Figura 5.17, dia de controlo do ciclo, revelou novamente a presença de um CQO residual. Neste dia com as condições de estabilidade para os microrganismos já atingidas voltamos a verificar valores totais de ácidos inferiores, valor médio de 113,0 mgCQO.L⁻¹ na fase de “fome”, ao CQO residual, 147,8 mgCQO.L⁻¹, que se mantêm aproximadamente por volta dos mesmos valores que na carga de 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, obtendo-se um valor de percentagem de AOV's no CQO residual de 76%.

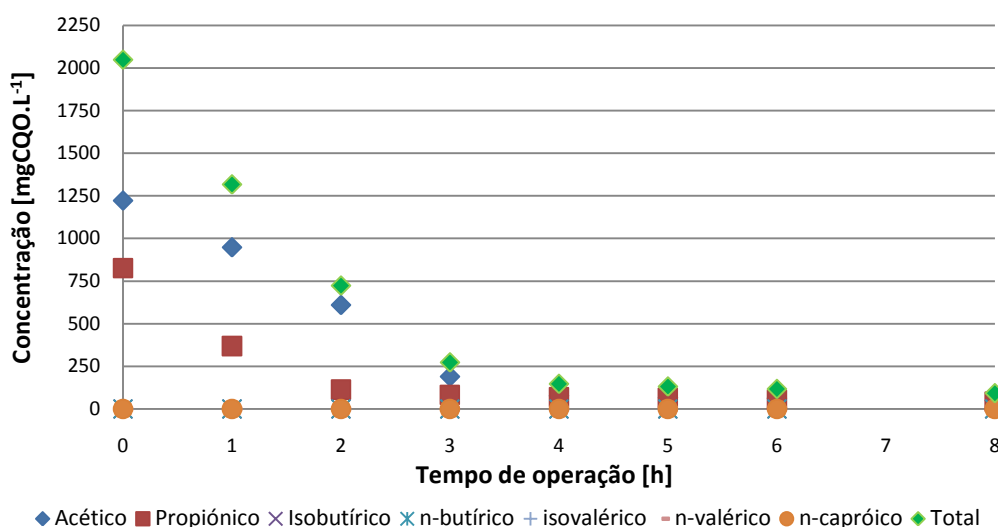


Figura 5.17 - Evolução dos AOV's no decorrer de um ciclo de operação, com carga orgânica de $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com iguais proporções de ácido acético e propiónico.

Como se pode confirmar através da análise da Figura 5.16 e Figura 5.17 a fase de “fartura”, instalada no instante 0h através do fornecimento da alimentação, é concluída 4h depois, quando os ácidos são consumidos quase por completo. Verificou-se um aumento do tempo de degradação dos ácidos para o dobro (passou de 2h, para a carga de $2\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, para 4h, na presente carga de $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

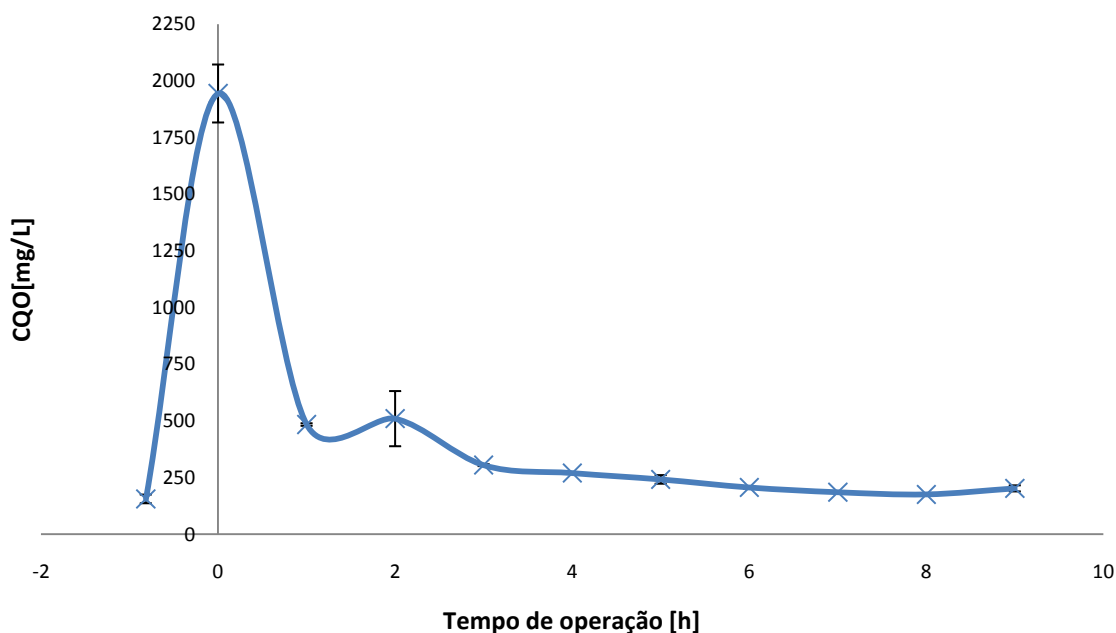


Figura 5.18 - Evolução da CQO no decorrer de um ciclo de operação, com carga orgânica de $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1.

Analisando a Figura 5.18, correspondendo ao controlo de um ciclo de operação para o reactor de proporção HAc:HP_r 2:1, verificamos o consumo do substrato em

aproximadamente 1h e um CQO residual em média de 226,8 mgCQO.L⁻¹ na fase de “fome”. Analisando os AOV's para o controlo deste ciclo, Figura 5.19, verificamos mais uma vez que possuem valores inferiores ao CQO residual, média de 113,2 mgCQO.L⁻¹ em AOV's, correspondendo os AOV's a 50% do CQO residual.

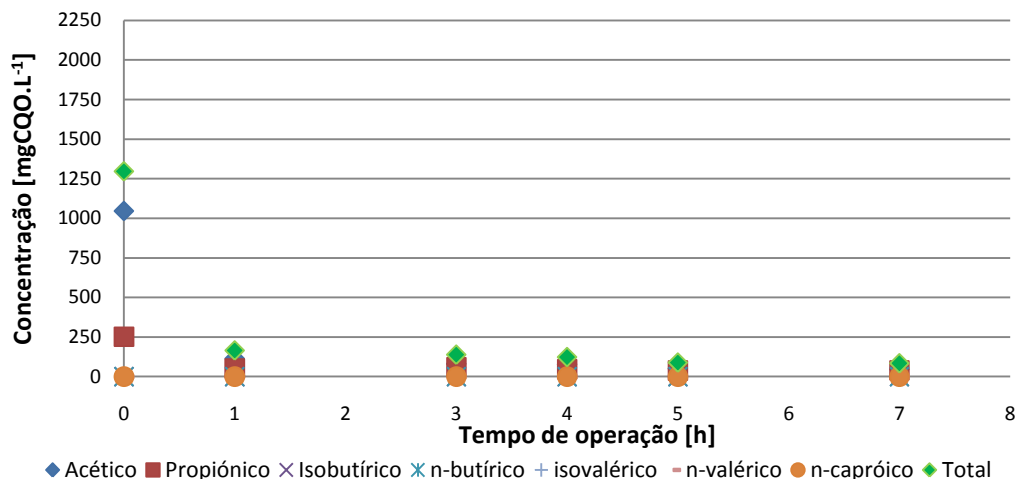


Figura 5.19 - Evolução dos AOV's no decorrer de um ciclo de operação, com carga orgânica de 4gCQO.L⁻¹.d⁻¹ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 2:1.

Apesar de se ter corrigido o pH no início do ciclo, para 8,7 em ambos os reactores, a evolução do pH ao longo do decorrer do ciclo, levou a um aumento para valores próximos de 9,2, HAc:HPr, 1:1, e 9,4, HAc:HPr, 2:1, Figura 5.20.

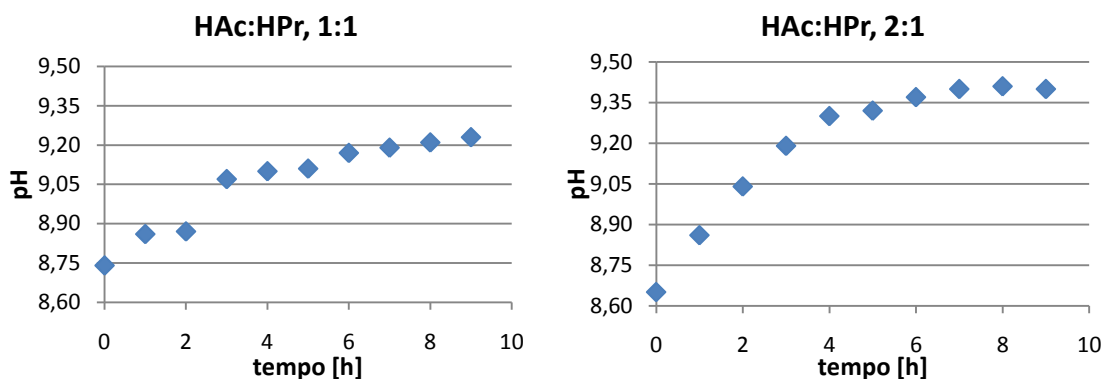


Figura 5.20 - Evolução do pH no decorrer do controlo de um ciclo, com carga orgânica de 4gCQO.L⁻¹.d⁻¹ e reactor com proporções de ácido acético e propiónico, 1:1 e 2:1.

A razão pela qual não foi efectuado controlo de ciclo para a carga de 8 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ para nenhuma das duas proporções de HAc:HPr, encontra-se desenvolvida no capítulo 6, microbiologia.

5.2.1 ANÁLISE COMPARATIVA DOS REACTORES

i. Evolução da biomassa nos reactores

Através da análise dos declives das rectas de crescimento no ponto 5.4.1.1 deste trabalho, para a proporção HAC:HPr 1:1, verificamos que a carga $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ possui um crescimento superior com um declive de crescimento de aproximadamente 0,6331, sendo o crescimento da biomassa 3 vezes superior ao verificado para a carga de $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, com 0,2302 de declive de crescimento. Para a carga de $4 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ verificou-se um pequeno decréscimo do declive de crescimento para com 0,2038, Figura 5.21.

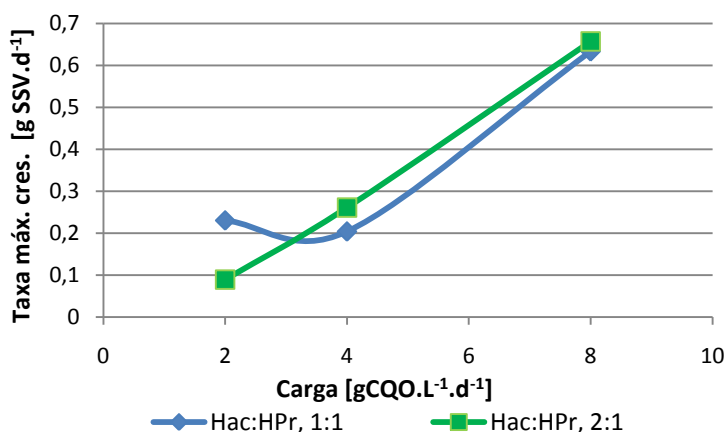


Figura 5.21 – Evolução da taxa de crescimento da biomassa para as cargas estudadas.

Para a proporção HAC:HPr 2:1, ponto 5.4.1.2 desta tese, por análise da inclinação das rectas verificamos declives de crescimento de biomassa de 0,6569 para a carga de $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, 2,5 vezes superior à carga de $4 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, declive de 0,2609, sendo este 3,5 vezes superior ao crescimento de biomassa verificado para a carga de $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, declive de 0,0892, Figura 5.21.

Analisando a **Figura 5.22** verificamos oscilações da taxa específica de crescimento em torno do valor de 1, obtendo-se valores inferiores a 1 no reactor HAC:HPr 1:1, nos primeiros 30 dias de operação para a carga $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, nos primeiros 5 dias da carga $4 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e para todos os dias de operação da carga $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. No respeitante ao reactor HAC:HPr 2:1 obtivemos valores inferiores a 1 nos primeiros 16 dias de operação para a carga $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, nos primeiros 12 dias da carga $4 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e também para todos os dias de operação da carga $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Valores inferiores a 1 indicam-nos que os microrganismos não estão a degradar todo o substrato que lhes é disponibilizado, estando o substrato em excesso, quer seja por ainda se encontrarem em adaptação às condições, como deverá ser a explicação para a carga $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $4 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ou por mau desempenho do reactor como ocorreu para a carga $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

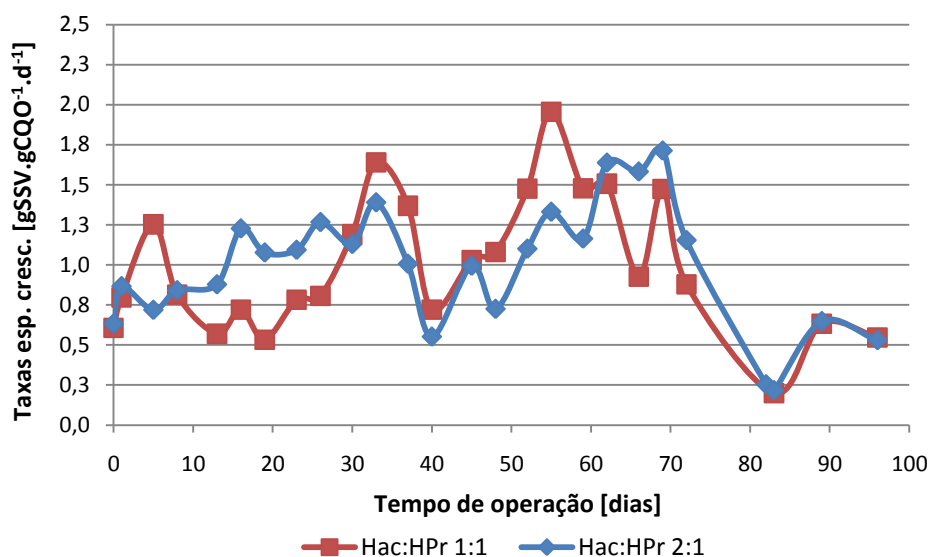


Figura 5.22 - Perfis das taxas específicas de crescimento para ambos os reactores ao longo do tempo.

Para os restantes dias de operação embora se verifiquem oscilações devidas às alterações experimentais já discutidas nos pontos 5.2.1.1 e 5.2.1.2 desta tese e também à variação dos valores do CQO da alimentação, Figura 5.9 e 5.10. Os valores permanecem praticamente sempre acima de 1 obtendo-se máximos de taxa específica de crescimento para o reactor HAC:HPr 1:1, de 1,64 e 1,96 d^{-1} para as cargas 2 e 4 $\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, dias 33 e 55, respectivamente. E, para o reactor HAC:HPr 2:1, máximos de taxa específica de crescimento de 1,39 e 1,71 d^{-1} , para as cargas 2 e 4 $\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, dias 33 e 69 de operação, respectivamente. Taxas específicas de crescimento superiores a 1 indicam-nos que nos encontramos perante condições de limitação de substrato. Com o aumento da taxa específica de crescimento, aumenta o número de gerações que irão ocorrer no mesmo período de tempo, mais rapidamente se irão dividir as populações e menor será o tempo de cada geração.

Apesar de observarmos maiores valores de taxa específica de crescimento para o reactor de proporção 1:1 temos de verificar que, embora seja de nosso interesse obter microrganismos que possam se encontrar em grande quantidade em solução, porque aumenta a quantidade de polímero produzido, é importante referir que não é o nosso objectivo seleccionar microrganismos com boa resposta de crescimento e sim com boa capacidade de acumulação de polímeros. Para analisar quais destes dois tipos de microrganismos se encontravam em solução nestes dois reactores foi efectuada a análise de ciclos presente no ponto 5.2.3 desta tese bem como testes microbiológicos, capítulo 6 deste trabalho.

ii. pH dos reactores

A nível do pH do reactor, este era corrigido, para valores na ordem de 8,7 e o pH da alimentação era corrigido para 6, sempre que se efectuava uma nova alimentação mas, por análise da curva de pH obtida no final dos primeiros ciclos verificou-se que a sua tendência era crescente, o que indica que os reactores estavam a operar sem controlo de pH.

De forma a tentar baixar o pH do reactor, para níveis inferiores a 9, foi alterado o pH da alimentação no final da operação a carga de $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, passando de 6 para 5,5. Pela análise das Figura 5.15 e Figura 5.20, verificamos que o pH aumenta para valores superiores a 9, independentemente do valor da carga ou da proporção do substrato.

Desta forma, não era fundamental, mas poderia ter sido efectuada uma correcção contínua do pH dos reactores para valores entre 7,5 a 9. Mesmo que os valores de pH nos reactores não sejam muito superiores a 9, variando de 9,2 a 9,5, a actividade da biomassa para valores superiores a 9 começa a diminuir, sendo praticamente inexistente para pH de 10,5 (VILLANO *et al.*, 2010)

iii. CQO residual

Uma das surpresas deste trabalho foi a quantidade de CQO residual sempre presente, em todos os reactores, com valores bastante similares, independentemente da carga imposta ou da proporção de substrato utilizado.

A possibilidade de aquele CQO residual ser composto somente por ácido acético e propiónico não degradado não se verificou através da análise efectuada aos AOV's. Embora estes também estejam presentes em quantidades residuais, indicando que os microrganismos embora entrem na fase de "fome", não degradam todo o substrato que lhes é fornecido, existe outra causa que contribui para a existência do CQO residual restante.

A tentativa de descobrir a causa através da substituição da ureia por cloreto de amónio revelou-se infrutífera a nível de resultados finais, não havendo alterações a nível de AOV's e CQO residual.

Por comparação dos valores de percentagem de AOV's no CQO residual para os dias analisados na Figura 5.12 B, reactor HAc:HPr 2:1, verificamos que a percentagem de AOV's no CQO residual não possui variações significativas, mantendo-se em valores médios de 70%. Para o reactor HAc:HPr 1:1, Figura 5.11 B, a percentagem de AOV's no CQO residual encontra-se em valores médios de 50%, para as duas primeiras cargas, à excepção do dia 59 como já foi referido anteriormente. Comparando o reactor HAc:HPr 1:1 com o HAc:HPr 2:1, verificamos a existência de uma diferença de percentagem de AOV's no CQO residual, porém, não foi confirmada outra fonte para o restante valor de CQO residual e como o valor de AOV's em concentração não difere significativamente nas análises para ambos os reactores, podemos dizer que a fonte desconhecida para o CQO residual se encontra em maior quantidade no reactor HAc:HPr 1:1. Outra possível causa seria a diminuição da actividade da biomassa devido ao valor de pH superior a 9 verificado nos reactores.

iv. Fase de “fartura”

Analisando os quatro ciclos para as cargas 2 e 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ verificamos que os que iniciam a fase de “fome” mais rapidamente correspondem ao reactor alimentado com substrato de proporção HAc:HPr 2:1, terminando a sua fase de fartura após 1h. Analisando as cargas 2 e 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, verificamos que o reactor com carga 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, possui melhor resposta, uma vez que degrada o dobro do substrato no mesmo período de tempo que para a carga inferior, 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹.

Para a proporção HAc:HPr 1:1, o aumento da carga não favoreceu a selecção de microrganismos acumuladores de PHAs. Para o reactor com carga de 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ a fase de “fome” foi instalada 2h após se ter adicionado a alimentação, mas com o aumento da carga para 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ aumentou também para o dobro o tempo de início da fase de “fome”, 4h. Porém o reactor revelou a nível funcional um excelente valor de remoção de matéria orgânica, quase sempre superior a 95%.

Através da literatura revista no ponto 3.5.2 deste trabalho, sabe-se que para que não sejam seleccionados microrganismos com resposta de crescimento a razão entre a extensão da fase de fartura e a extensão de todo o ciclo não deve exceder aproximadamente 0,25 (DIONISI *et al.*, 2006c).

Perante este dado, analisando a razão entre a fase de fartura e fase de fome, para o reactor de proporção HAc:HPr 1:1, carga 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, obtemos um valor de 0,3 e portanto superior aos 0,25 indicados na literatura, indicando que este reactor já não estaria a fazer somente a selecção de microrganismos com capacidade de acumulação de polímeros como também já estava a seleccionar microrganismos com resposta de crescimento, o oposto do requerido para este trabalho. O comportamento que o reactor estava a manifestar, aumentando de 2 para 4h o tempo de início da fase de “fome” com o aumento de carga de 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ para 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, juntamente com a conclusão de que este reactor já estaria a seleccionar microrganismos com resposta de crescimento fez com que se efectuasse a substituição destas lamas para continuar o estudo.

Desta forma este reactor foi inoculado novamente com lamas provenientes do reactor de proporção HAc:HPr 2:1, que revelava um bom comportamento e desenvolvimento, com eficiências de remoção quase sempre superiores a 95%, mas continuando a operar sob as condições de proporção HAc:HPr 1:1.

Para o reactor HAc:HPr 1:1, carga de 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, cujo tempo de “fartura” foi de 2h, e para o reactor HAc:HPr 2:1, carga de 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ e 4gCQO.L⁻¹.d⁻¹, em que o período necessário para entrar na fase de “fome” foi sempre de 1h, obtemos valores de rácio de 0,17 e 0,08, respectivamente, inferiores ao 0,25 da literatura (DIONISI *et al.*, 2006c), indicando que estes reactores, nestas condições de operação, estariam a seleccionar microrganismos com capacidade de acumulação de polímeros.

5.2.2 ANÁLISE GLOBAL

Através da análise anterior efectuada à evolução da biomassa nos reactores verificamos que o reactor HAc:HPr 1:1 possuía maiores valores de taxa de crescimento em comparação com o reactor HAc:HPr 2:1. Porém, tal como foi dito teria de se analisar os ciclos para poder tirar conclusões mais precisas. De acordo com a análise efectuada à fase de “fartura”, ponto iv, viemos a comprovar que o reactor HAc:HPr 1:1 estaria efectivamente a seleccionar microrganismos com resposta de crescimento para a carga 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹. Para a carga 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, como foi verificado, ainda se encontraria a efectuar a selecção de microrganismos com capacidade de acumulação de polímeros mas com a fase de “fartura” superior à verificada para o reactor HAc:HPr 2:1.

À luz destes dados era importante confirmar se efectivamente os microrganismos seleccionados estariam a acumular polímeros. Para isto foram efectuados testes microbiológicos, nomeadamente o teste do Negro de Sudão e do Azul do Nilo, capítulo 6.

Os testes efectuados neste trabalho, foram para cargas muito baixas 2, 4 e 8 gCQO.L⁻¹, pelo que seria interessante continuar a aumentar a carga para valores superiores e verificar o seu comportamento, uma vez que de acordo com a literatura a capacidade de armazenamento de polímeros se encontra na gama 8,5-20 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ (DIONISI *et al.*, 2006c).

Analisando o efeito do aumento da carga verificamos pelos resultados que o aumento não influencia a capacidade de remoção rápida de substrato do meio, pelo menos no que diz respeito à proporção HAc:HPr 2:1. Embora 1h seja um valor elevado de acordo com a literatura, temos de ter em atenção que a alimentação foi fornecida de forma contínua, durante 20min e não em um único instante. Temos de verificar também que a primeira análise efectuada foi para 1h de funcionamento. Dever-se-ia ter efectuado análises menos espaçadas no tempo durante as primeiras 3h da fase de fartura.

Quanto ao substrato o reactor de proporção HAc:HPr 2:1 teve um melhor funcionamento, adaptando-se melhor às variações de carga. Como possui maior quantidade de ácido acético, do que o reactor HAc:HPr 1:1, sendo este mais facilmente assimilado que o ácido propiónico e considerado (já várias vezes verificado experimentalmente) como o melhor substrato para acumulação de polímeros, o reactor que possui maior quantidade deste vai reflectir melhor performance, como se veio a verificar.

CAPÍTULO 6

CONTROLO MICROBIOLÓGICO

6.1 MONITORIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA OPERAÇÃO DOS REACTORES

6.1.1 AMOSTRAGEM

Para efectuar a monitorização microbiológica dos reactores, foram colhidas amostras frescas para análise imediata e foram também colhidas amostras para preservação, no final de cada ciclo e sempre que ocorria alguma situação anormal.

As amostras frescas foram utilizadas para realizar os testes designados na identificação de microrganismos, ponto 6.1.2 desta tese, e para a visualização das substâncias poliméricas extracelulares (SPE), ponto 6.1.3 deste trabalho.

As amostras colhidas para preservação foram utilizadas para a identificação de PHAs, ponto 6.1.4 desta tese. Estas amostras foram preservadas adicionando 5 gotas de clorofórmio a 5ml de amostra fresca tendo posteriormente sido refrigeradas. Para efectuar a análise de polímeros através do método de Azul do Nilo era necessário um microscópio de epifluorescência⁸. Uma vez que este equipamento não existe nas instalações do Departamento de Ambiente e Ordenamento, as amostras foram enviadas para visualização da presença de PHAs em Lisboa.

Para proceder à análise microbiológica foram utilizadas lâminas Star Frost (76x26mm/3x1inch), lamelas Normax (18x18mm) e um microscópio óptico, Figura 6.1.



Figura 6.1 – Microscópio utilizado para a visualização microbiológica das amostras.

⁸ Microscópio de epifluorescência - utiliza luz ultravioleta para excitar determinados electrões e fazer com que mudem para uma órbita de maior energia. Ao voltar ao estado inicial de energia emitem luz formando a imagem.

6.1.2 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Com o objectivo de efectuar o controlo microbiológico no decorrer da operação dos reactores foram efectuadas análises às bactérias, nomeadamente às bactérias filamentosas que nos fornecem dados importantes quanto à detecção ou prevenção de evoluções menos desejáveis da população bacteriana nos reactores. Procedeu-se também à quantificação de protozoários de forma a ser possível avaliar a performance e eficiência do processo.

6.1.2.1 ANÁLISE DE BACTÉRIAS

A importância do estudo das bactérias é indiscutível uma vez que são as bactérias que acumulam os polímeros. O teste descrito abaixo como teste de Gram, ainda que tenha sido previsto inicialmente ser efectuado, acabou por não o ser. Apesar de ser um teste importante a nível microbiológico, não nos fornece informação útil adicional no sentido do controlo microbiológico de culturas mistas para a produção de PHAs.

Por seu lado se tivéssemos como objectivo identificar as espécies de bactérias presentes em solução para posterior identificação das bactérias acumuladoras de polímeros, já se tornaria pertinente efectuar este teste.

i. Teste Gram (JENKINS et al., 2004)

Gram negativo – coloração tons vermelho

Gram positivo – coloração azul escura/violeta

Reagentes

Solução 1 – Preparar em separado a Solução 1A e 1B e depois juntar

Solução 1A – Dissolver 2g de violeta de cristal em 20ml de etanol 95%.

Solução 1B – Dissolver 0,8g de oxalato de amónio em 80ml de água destilada

Solução 2 – Dissolver 1g de iodo e 2g de iodeto de potássio em 300ml de água destilada

Solução 3 – Juntar 10ml de safranina a 100ml de água destilada

Procedimento

- 1- Numa lâmina, colocar uma pequena quantidade de lama biológica fresca e deixar secar ao ar;
- 2- Depois de seca, mergulhar na Solução 1 durante 1min e em seguida lavar com água;
- 3- Mergulhar na Solução 2 durante 1min e em seguida lavar com água;
- 4- Lavar a lâmina com solução descolorante ou álcool 95% à gota durante 25seg e enxaguar com papel absorvente;
- 5- Mergulhar na Solução 3 durante 1min e lavar com água;
- 6- Enxaguar com papel absorvente.

ii. FISH (“fluorescent in situ hybridization”)

Quando se possuem amostras demasiado complexas e se pretende diferenciar populações específicas de entre um conjunto existente numa amostra mista, é necessário recorrer a técnicas com marcadores de elevada especificidade molecular. O método mais utilizado nestes casos é o método de “fluorescent in situ hybridization” (*FISH*) (DAIMS *et al.*, 2007).

Neste método são usadas sondas de oligonucleótidos complementares de cadeias 16S ou 23S de *rRNA* (ácido ribonucleico ribossomal) específicas de certos grupos filogenéticos, e que são visíveis utilizando microscopia de fluorescência (AMANN *et al.*, 1995, DELONG *et al.*, 1989). Dependendo do grau de conservação da sequência na sonda, relativamente ao *rRNA* alvo, o método *FISH* pode detectar desde espécies microbianas individualmente, ou detectar grupos filogenéticos maiores, tais como um género ou um filo (AMANN *et al.*, 1995). O método de *FISH* também permite a identificação de até 7 diferentes populações em uma única amostra (AMANN *et al.*, 1996).

No âmbito da análise de culturas mistas este método pode ajudar na identificação de espécies de bactérias produtoras de PHAs, bactérias filamentosas e protozoários. Podemos verificar esquematizado na Figura 6.2 o processo geral para efectuar este tipo de método complexo de identificação de espécies.

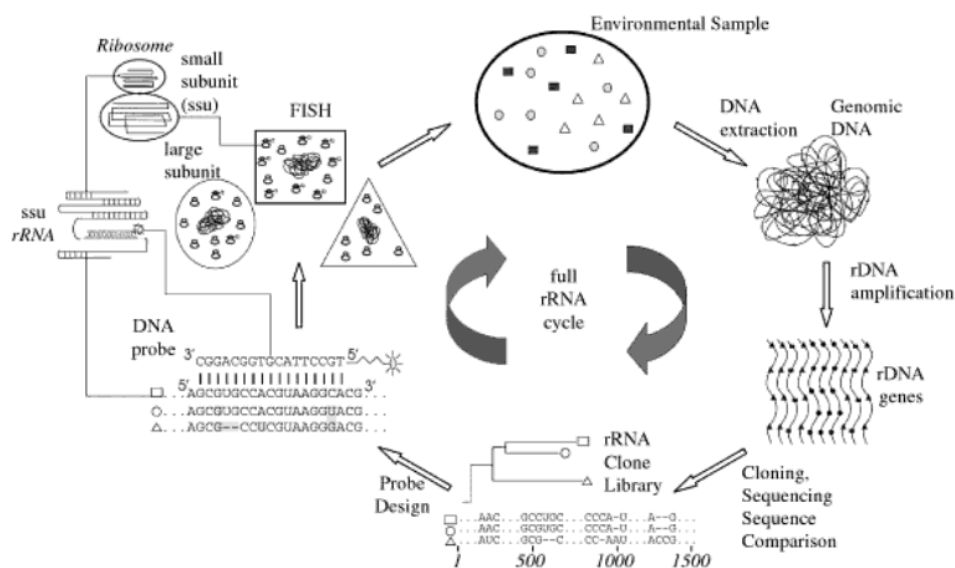


Figura 6.2 – Ciclo completo do rRNA para análise de comunidades microbóticas (SEVIOUR *et al.*, 2010).

6.1.2.2 CARACTERIZAÇÃO DE ORGANISMOS FILAMENTOSOS EM LAMAS ACTIVADAS

A identificação e monitorização das espécies de bactérias filamentosas é fundamental para uma avaliação correcta do funcionamento de sistemas biológicos. A monitorização permite a detecção ou prevenção de problemas, podendo assim actuar rapidamente para resolução rápida dos mesmos.

O reconhecimento de organismos filamentosos pode ser efectuado através de métodos com base em características morfológicas, bioquímicas e de coloração (JENKINS *et al.*, 2004). A identificação de bactérias filamentosas não é um processo de fácil execução, sendo um processo extremamente trabalhoso e dependente em larga medida da experiência do técnico. Para além disso existe uma grande diversidade de espécies de bactérias filamentosas, em que é praticamente impossível para muitas delas obter culturas puras para o seu estudo, e existe uma parte delas que ainda permanece desconhecida (JENKINS *et al.*, 2004). Para além das limitações descritas, muitas bactérias filamentosas (ex.: *Sphaerotilus natans*, 1701, 0092 e 0961) podem alterar a sua morfologia como resposta a alterações das condições ambientais (SEVIOUR *et al.*, 2010).

Para efectuar a identificação de bactérias filamentosas recorre-se ao uso de uma chave dicotómica. Esta é preenchida através da análise microscópica das várias características dos filamentos, tais como: diâmetro do filamento, comprimento, forma, ramificações, bainha, septos celulares, localização, mobilidade, abundância, efeito na estrutura dos flocos, depósitos de enxofre, outros depósitos, teste de colorações: Gram e Neisser. Esta informação é posteriormente cruzada com a chave dicotómica, Anexo D, para identificação da espécie de filamento.

Para a elaboração desta tese foi efectuada uma análise qualitativa das bactérias filamentosas tendo em conta as seis categorias propostas na análise qualitativa de Jenkins *et al.*, 2004, descrita na Tabela 6.1.

De forma a facilitar a visualização e captação de imagens, foi efectuada uma coloração com safranina 0,5 w/v das várias amostras.

Tabela 6.1 – Análise qualitativa da abundância das bactérias filamentosas (JENKINS *et al.*, 2004).

Valor numérico	Abundância	Caracterização
0	Nenhuma	Sem filamentos presentes
1	Pouca	Com filamentos, mas só presentes em alguns flocos ocasionais
2	Alguma	Filamentos observados, mas não presentes em todos os flocos
3	Comum	Filamentos observados em todos os flocos, mas a baixa densidade (1 a 5 filamentos por floco)
4	Muito comum	Filamentos observados em todos os flocos, mas a média densidade (5 a 20 filamentos por floco)
5	Abundante	Filamentos observados em todos os flocos, a alta densidade (superior a 20 filamentos por floco)
6	Excessiva	Filamentos observados em todos os flocos, mais filamentos que flocos e /ou filamentos em grande abundância no licor misto

6.1.2.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS

É importante a observação dos protozoários e metazoários encontrados nas lamas biológicas, pois a sua presença pode ser relacionada com a performance do processo e com sua eficiência. A partir destas observações pode-se diagnosticar as condições de tratamento, de forma a melhorar a qualidade do efluente. A observação da microfauna pode ser usada como um parâmetro adicional de controlo, obtendo-se uma resposta mais rápida do que acontece numa estação de tratamento, antes do que as análises físico-químicas convencionais o possam demonstrar (CRUDS *et al.*, 1970).

Esta identificação pode ser efectuada directamente através da análise e contagem de todas as formas de vida protozoários ou micrometazoários visualizados, podendo ser efectuada de forma mais ou menos rigorosa. Como método mais rigoroso, além da análise de FISH já referida anteriormente, temos o índice biológico das lamas, é o método mais utilizado uma vez que são atribuídos valores numéricos à qualidade biológica permitindo verificar e comparar a evolução da qualidade das lamas ao longo do tempo.

Para este trabalho experimental efectuamos uma abordagem qualitativa, também utilizada para a análise da qualidade das lamas, descrita no seguinte procedimento:

i. Quantificação de protozoários

Procedimento (JENKINS *et al.*, 2004)

- 1- Colocar 25µl de lama biológica fresca numa lâmina;
- 2- Fazer a montagem com lamela, de forma a não produzir bolhas de ar;
- 3- Proceder à identificação e quantificação.

Efectuar a contagem numa ampliação de 100x, de todos os protozoários e micrometazoários existentes examinando toda a área da lamela. Efectuar a média de 4 ou 5 preparações.

Se existir uma grande quantidade de organismos, como acontece muitas vezes para os flagelados, deve-se efectuar o seguinte: contar o número de espécies presentes em cada campo de visão, a 100x, para 10 ou 20 campos de visão, e multiplicar essa média por o número de campos de visão existentes em toda a área da lamela (tipicamente cerca de 300 para uma ampliação de 100x para lamelas de área de superfície 22mm x 22mm).

Métodos para interpretação da análise qualitativa de identificação de protozoários

Através da quantificação dos protozoários é possível verificar quais os grupos dominantes presentes em solução nas lamas activadas. Estes dados são utilizados para analisar as características do processo, desempenho e possíveis causas, no caso de desempenho médio ou fraco. Abaixo estão presentes alguns métodos utilizados para a avaliação do funcionamento do sistema.

- **Madoni (1994) e Figueiredo *et al.* (1997)**

De acordo com Madoni, 1994, e Figueiredo *et al.*, 1997, um bom desempenho do sistema biológico está directamente relacionado com as espécies dominantes no processo, conforme as relações descritas nas Tabelas 6.2 e 6.3.

Tabela 6.2 - Microrganismos indicadores das condições de depuração (FIGUEIREDO *et al.*, 1997).

Microrganismos	Características do processo
Predominância de flagelados e amebas	Lamas jovens, característica de início de operação ou baixa idade das lammas
Predominância de flagelados	Deficiência de arejamento, má depuração e sobrecarga orgânica
Predominância de ciliados pedunculados e livres	Boas condições de depuração
Predominância de Arcella (ameba com teca)	Boa depuração
Predominância de Aspidisca costata	Nitrificação
Predominância de Trachelophyllum	Alta idade das lammas
Predominância de Vorticella microstoma (ciliado pedunculado) e baixa concentração de ciliados livres	Efluente de má qualidade
Predominância de anelídeos do género Aeolosoma	Excesso de oxigénio dissolvido
Predominância de filamentos	Intumescimento das lammas

Tabela 6.3 - Desempenho de estações de tratamento indicadas por grupos dominantes da microfauna (MADONI, 1994).

Grupo dominante	Desempenho	Causas prováveis
Pequenos flagelados	Fraco	Deficiência de arejamento, choques devido a sobrecarga e presença de subprodutos da fermentação
Pequenos ciliados livres nadadores	Médio	Deficiência de arejamento, baixo tempo de retenção hidráulico
Grandes ciliados livres nadadores	Médio	Choques devido a sobrecarga e deficiência de arejamento
Ciliados predadores de flocos	Boa	—
Ciliados fixos e ciliados predadores de flocos	Boa	—
Ciliados fixos	Decrescendo	Fenómeno de transição
Pequenas amebas e flagelados	Muito fraco	Alta carga de compostos de difícil degradação
Amebas com teca	Boa	---

- **Método de (MARCO *et al.*, 1991)**

De Marco *et al.* (1991), classificaram as estações de tratamento em 3 categorias, baseadas na densidade total dos protozoários presentes:

- (a) Sistemas ineficientes, aqueles com aproximadamente 10 organismos.mL⁻¹;
- (b) Sistemas pouco eficientes, aqueles com densidades de 10-10³ organismos.mL⁻¹;
- (c) Sistemas eficientes, aqueles com 10³ ou mais organismos.mL⁻¹.

- **Método de (BEDGONI *et al.*, 1991)**

Bedgoni (1991) sugere que a razão entre ciliados predadores de flocos e ciliados fixos, está associada à eficiência do processo de tratamento. Quando a razão é maior ou igual a 0,5, é obtido um efluente de melhor qualidade.

ii. Índice Biótico das Lamas (IBL)

Este é um método mais rigoroso de efectuar a monitorização das populações na componente biótica das lamas.

O Índice Biótico das Lamas (SBI, Sludge Biotic Index) sugerido por Paolo Madoni, 1994, baseia-se na abundância e na diversidade específica da comunidade de protozoários e nas diferentes sensibilidades reveladas por alguns grupos da microfauna aos factores físico-químicos preponderantes no sistema (Anexo B).

Este método é baseado em dois princípios (MADONI, 1994). Em primeiro lugar verificamos, as alterações no domínio dos protozoários em relação às condições ambientais e operacionais. Por exemplo, alguns protozoários, como pequenos flagelados e ciliados, *Vorticella microstoma* e *Opercularia spp*, podem ter uma influência negativa sobre o valor do índice. Em segundo lugar, a diminuição da densidade das células e do número de grupos taxonómicos diminui a eficiência operacional do sistema. O IBL permite ao operador definir a qualidade biológica das lamas através de valores numéricos convencionais (0-10), agrupadas em quatro classes de qualidade.

Uma das vantagens desta abordagem reside no facto da avaliação ser feita através de valores numéricos, (Anexo C) o que permite ao operador comparar a qualidade biológica das lamas no tanque de arejamento ao longo do tempo (MADONI, 1994).

Como o IBL foi criado especificamente para a avaliação do desempenho dos sistemas de lamas activadas, este índice é incapaz de revelar qualquer disfunção no decantador final, tais como problemas de *bulking* ou “*rising sludge*”.

6.1.3 VISUALIZAÇÃO DE MATERIAL POLIMÉRICO EXTRACELULAR

Este teste é utilizado para detectar *à priori* o desenvolvimento de bulking viscoso. Quando a tinta-da-china é adicionada a uma amostra fresca de lamas activadas, as partículas negras de carbono penetram no floco, tornando escuro todo o seu interior. Quando estão presentes grandes quantidades de material polimérico extracelular (SPE) as partículas de carbono não conseguem penetrar nos flocos formando uma aureola clara à volta dos flocos (JENKINS *et al.*, 2004).

A quantidade de SPE pode ser obtida analisando as lamas activadas para polissacarídeos e proteínas. A presença de *bulking* viscoso faz com que os carboidratos atinjam valores até 90% dos SSV (JENKINS *et al.*, 2004).

O protocolo do teste de tinta-da-china para visualização de material polimérico, utilizado neste trabalho laboratorial, encontra-se descrito abaixo.

i. Teste de tinta-da-china (JENKINS *et al.*, 2004)

Reagentes:

- Tinta-da-china (tinta preta de desenho à base de água)

Procedimento:

- 1- Misturar 1 gota de tinta-da-china com 1 gota de amostra de lamas activadas numa lâmina. Dependendo da quantidade usada pode ser necessário retirar o excesso de volume.
- 2- Colocar a lamela e observar a 100x usando um microscópio de contraste de fases.
- 3- Em lamas activadas normais, as partículas de tinta-da-china penetram nos flocos quase completamente, deixando no máximo os centros sem coloração. Em lamas activadas contendo grandes quantidades de material polimérico extracelular, são observadas vastas áreas limpas, observando-se baixa densidade celular.

6.1.4 IDENTIFICAÇÃO DE PHAS

Para a visualização da existência de PHAs recorreu-se a dois testes de coloração, o teste Negro de Sudão e o de Azul do Nilo.

O Negro de Sudão é usado como corante para o isolamento e detecção de colónias produtoras de PHAs. Porém, este corante demonstra baixa selectividade para os grânulos de PHAs e cora para além dos PHAs, quase todo o material lipofílico⁹ presente (OSTLE *et al.*, 1982, SHIROKITAMURA *et al.*, 1994).

⁹ Lipofílico – possui afinidade e é solúvel em lipídios

O Azul do Nilo é um corante que pode ser utilizado para detectar os grânulos de PHAs existentes nos citoplasmas das células. Estes podem ser observados por microscopia de epifluorescência obtendo uma coloração vermelha fluorescente devido à oxidação espontânea da oxazina básica, em meio aquoso, em oxazona Vermelho de Nilo, sendo esta última a verdadeira responsável pela coloração dada aos grânulos (SERAFIG *et al.*, 2000, SHIROKITAMURA *et al.*, 1994).

i. Negro de Sudão (JENKINS *et al.*, 2004)

Reagentes

Solução 1 – **Negro de Sudão B**, 0,3% w/v em 60% etanol

Solução 2 – Safranina O, 0,5% w/v solução aquosa

Procedimento

- 1- Preparar uma lâmina com uma pequena quantidade de lama biológica e deixar secar ao ar;
- 2- Corar 10min com a Solução 1 e adicionar mais Solução 1 se começar a secar;
- 3- Lavar 1seg com água;
- 4- Corar 10seg com a Solução 2, lavar bem com água, deixar secar;
- 5- Examinar com óleo de imersão a uma ampliação de 1000x com iluminação directa (sem contraste de fases). O PHA intracelular aparece como grânulos azuis/pretos, o citoplasma será rosa ou sem coloração.

ii. Azul do Nilo

Reagentes

Solução 1 – **Azul do Nilo**

Solução 2 – NaCl, 0.9% w/v solução aquosa

Solução 3 – CH₃CO₂H, 8% v/v solução aquosa

Procedimento

- 1- Colocar cerca de 1ml da cultura fresca num tubo eppendorf;
- 2- Adicionar 1 gota de Azul do Nilo;
- 3- Colocar a 55°C durante 10 min;
- 4- Centrifugar abaixo de 5000rpm durante 5 min;
- 5- Deitar fora o sobrenadante;
- 6- Ressuspender em NaCl 0.9%;
- 7- Centrifugar abaixo de 5000rpm durante 5min;
- 8- Deitar fora o sobrenadante;
- 9- Ressuspender em ácido acético 8%;
- 10- Agitar durante 1min;
- 11- Centrifugar abaixo de 5000rpm durante 5min;
- 12- Deitar fora o sobrenadante;
- 13- Ressuspender em NaCl 0.9%.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA MONITORIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA OPERAÇÃO DOS REACTORES

Ao longo do tempo de operação dos dois reactores SBR foi analisada qualitativamente a evolução microbiológica dos reactores bem como retiradas amostras para análise da existência de PHAs.

6.2.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA OPERAÇÃO DOS REACTORES

Para uma mais fácil compreensão da evolução dos reactores, a exposição dos resultados vai ser acompanhada pela análise dos mesmos ao longo do tempo para os dois reactores.

Carga 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹

A identificação de protozoários foi efectuada de acordo com o protocolo descrito em 6.1.3.1, tendo os microrganismos sido categorizados e agrupados de acordo com a Tabela de descrição da microfauna de Madoni *et al.*, 1984, Figueiredo *et al.*, 1997, e Jenkins *et al.*, 2004, descrita na Tabela 4.1.

De acordo com a análise à população de protozoários efectuada foi possível chegar aos seguintes valores de microfauna:

Tabela 6.4 – Microfauna existente em ambos os reactores para as cargas 2gCQO.L⁻¹.d⁻¹ e 4gCQO.L⁻¹.d⁻¹.

Grupos	Densidade da microfauna (organismos.mL ⁻¹)			
	Carga 2 gCQO.L ⁻¹		Carga 4 gCQO.L ⁻¹	
	HAc:HPr 1:1	HAc:HPr 2:1	HAc:HPr 1:1	HAc:HPr 2:1
Ciliados	$1,32 \times 10^3$	$2,28 \times 10^3$	$2,70 \times 10^3$	$4,74 \times 10^3$
Amebas	--	--	--	--
Flagelados	$1,20 \times 10^3$	$2,31 \times 10^2$	$2,10 \times 10^3$	$6,00 \times 10^2$
Micrometazoários	$1,20 \times 10^2$	--	--	--

Pela análise da Tabela 6.4 verificamos a predominância de pequenos ciliados livres e pequenos flagelados em todos os reactores. Para a carga de 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ verificou-se a predominância de ciliados nadadores livres, para ambos os reactores, indicando, segundo Madoni, 1994, um desempenho médio do sistema. As causas para este desempenho de sistema de acordo com, Madoni, 1994, seriam a insuficiência de oxigénio e o baixo tempo de retenção hidráulico.

Por volta do dia 13 de operação do sistema verificou-se a existência de espuma acastanhada densa e persistente no reactor HAc:HPr 2:1. A análise microbiológica às espumas não revelou qualquer tipo de bactérias filamentosas, Figura 6.3.

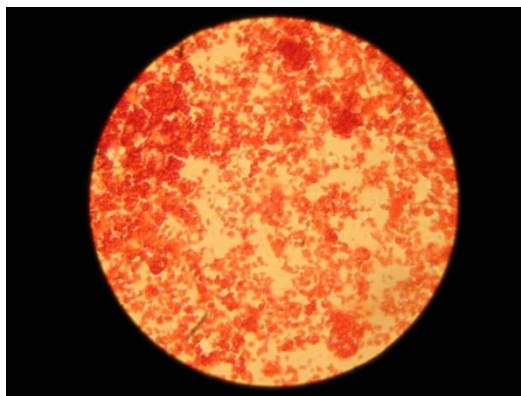


Figura 6.3 – Análise da espuma existente no reactor HAc:HPr 2:1, dia de operação 13, ampliação de 1000x.

Pela literatura sabe-se que as espumas castanhas além de poderem ser causadas pelas bactérias filamentosas, também podem ser causadas por problemas de desnitrificação, “blanket rising”, problema mais usual em sistemas de efluentes onde é adicionada amónia, como é o nosso caso. Esta parece ser a explicação mais válida para a causa do aparecimento da espuma acastanhada nesta fase de operação do sistema uma vez que a análise de filamentosas feita ao licor misto, para esta carga $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, também revelou a inexistência destas para o reactor HAc:HPr 2:1, Figura 6.4 B. Alguma desta espuma com biomassa transbordou do reactor e a restante que permanecia em suspensão foi retirada do reactor.

Para o reactor HAc:HPr 1:1, verificou-se o aparecimento de bactérias filamentosas, dia 23 de operação, Figura 6.4 A, tendo sido atribuído o valor numérico 2, alguma abundância de acordo com a análise qualitativa de Jenkins *et al.*, 2004. A existência das filamentosas permaneceu até à mudança de carga para $4 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

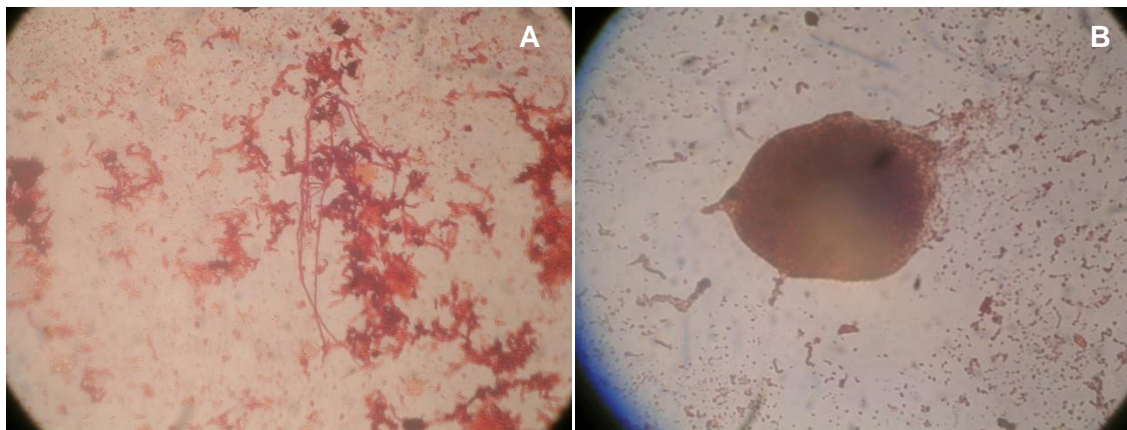


Figura 6.4 – Visualização de bactérias filamentosas no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, dia de operação 26, ampliação 100x.

No dia 26 de operação ocorreu o aparecimento e transbordo de espuma branca no reactor HAc:HPr 1:1. Este tipo de espuma surge em estações de tratamento devido ao próprio funcionamento do sistema biológico ou à presença de detergentes, não indicando nenhum problema de desempenho ou operação do sistema. Neste caso como não existia presença de detergentes, a causa da espuma produzida terá sido devido ao próprio

funcionamento do sistema. Desta forma foi adicionado anti-espumante ao reactor e a espuma desapareceu.

Pela comparação do funcionamento dos dois reactores verificou-se uma melhor sedimentação no reactor HAc:HPr 2:1 que no reactor HAc:HPr 1:1. Como a quantidade de bactérias filamentosas existente não deveria influenciar a sedimentação das lammas uma vez que não são muito abundantes, efectuou-se, no dia 26 de operação, a visualização microscópica das SPE, Figura 6.5.

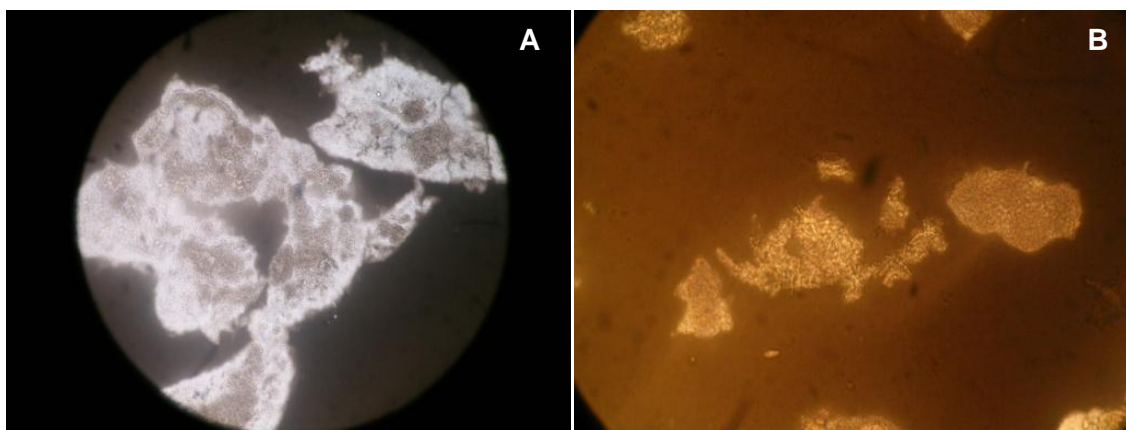


Figura 6.5 - Teste de SPE no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, dia de operação 26, ampliação 100x.

Através da análise da Figura 6.5 verificamos que o teste deu positivo para o reactor HAc:HPr 1:1, Figura 6.5 A, e negativo para reactor HAc:HPr 2:1, Figura 6.5 B, o que pode explicar a melhor sedimentabilidade das lammas do reactor HAc:HPr 2:1.

Carga 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹

Para a carga de 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, tabela 6.4, verificou-se o aumento dos ciliados nadadores livres e flagelados para ambos os reactores. Com o aumento de carga, para este valor verificou-se a manutenção da eficiência do sistema para ambos os reactores, e um aumento da densidade de microrganismos, embora a diversidade de espécies tenha diminuído para o reactor HAc:HPr 2:1.

Através da análise das bactérias filamentosas verificamos a sua ausência no reactor HAc:HPr 2:1, Figura 6.6 B, e o aumento destas no reactor HAc:HPr 1:1, Figura 6.6 A, passando a serem comuns, valor 3 da escala qualitativa de Jenkins *et al.*, 2004.

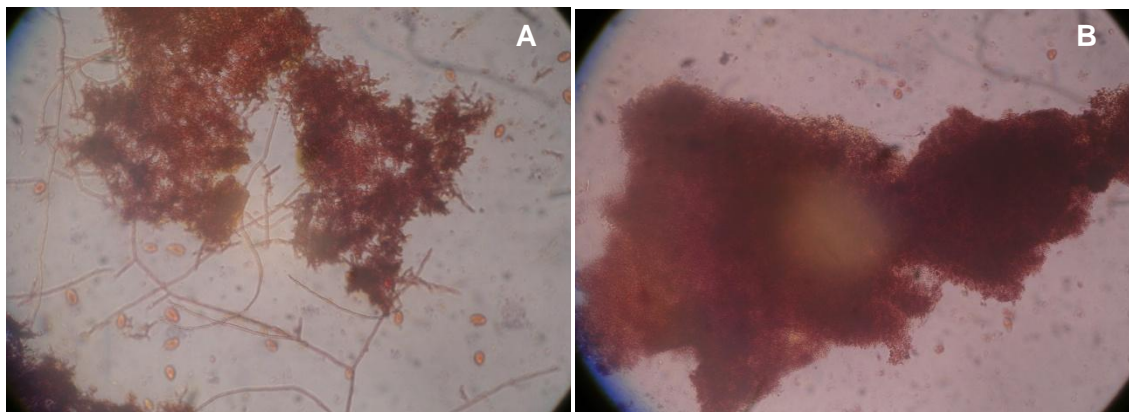


Figura 6.6 - Visualização de bactérias filamentosas no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, dia de operação 69, ampliação 100x.

No dia de operação 69, começou a verificar-se o aumento da dificuldade em filtrar as amostras para análise de SS e AOV's. Procedeu-se então à visualização das SPE, verificando-se os mesmos resultados que para a carga de 2 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, isto é, um resultado positivo para o reactor HAc:HPr 1:1 e negativo para o reactor HAc:HPr 2:1, Figura 6.7.

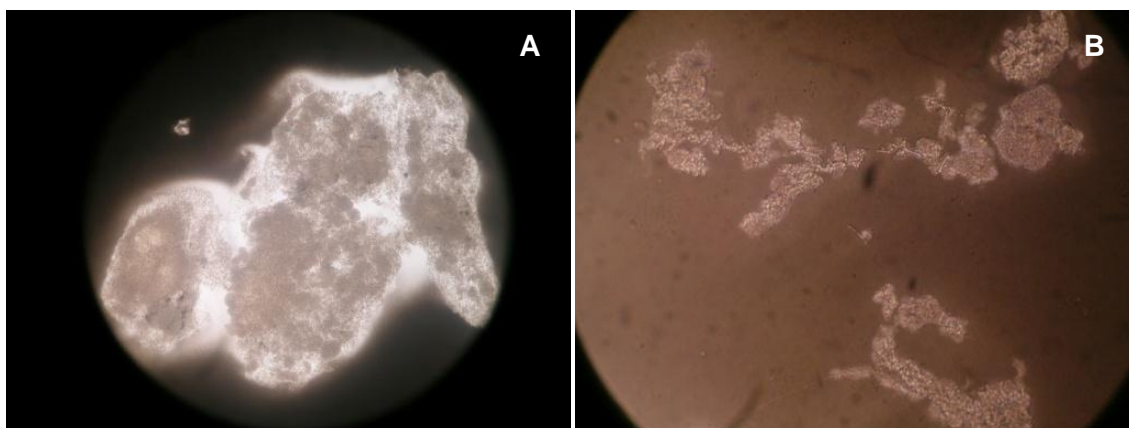


Figura 6.7 - Teste de SPE no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, dia de operação 69, ampliação 100x.

Através dos resultados obtidos pela análise de CQO durante o controlo de ciclo, ficou decidido que se iria descartar o reactor HAc:HPr 1:1, no dia de operação 72, esta resolução vem também ser apoiada através da análise microbiológica visto que as lammas deste reactor nesta fase já começavam a evidenciar um aspecto gelatinoso característico do *bulking* viscoso.

Carga 8 gCQO.L⁻¹

Como houve a inoculação do reactor HAc:HPr 1:1 com as lammas do reactor HAc:HPr 2:1 e um curto período de transição da carga 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ para 6 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ e depois para 8 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, era importante saber como reagiram os microrganismos às novas condições nos dois reactores e quais as condições iniciais de funcionamento para a

carga de $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Desta forma as lamas foram analisadas microscopicamente no início de operação à carga $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, dia 82.

Tabela 6.5 - Microfauna existente em ambos os reactores para a carga $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Grupos	Densidade da microfauna (organismos.mL ⁻¹)			
	Dia 82		Dia 98	
	HAc:HPr 1:1	HAc:HPr 2:1	HAc:HPr 1:1	HAc:HPr 2:1
Ciliados	$1,50 \times 10^3$	$2,94 \times 10^3$	$3,18 \times 10^3$	$3,36 \times 10^3$
Amebas	--	--	--	--
Flagelados	$3,00 \times 10^2$	$6,00 \times 10^2$	$7,50 \times 10^2$	$3,00 \times 10^2$
Micrometazoários	--	--	--	--

Com as alterações efectuadas aos reactores nesta última carga, (inoculação do reactor HAc:HPr 1:1 com as lamas provenientes do reactor HAc:HPr 2:1) a população microbiana prevalece com domínio dos ciliados. Como pudemos verificar, pela Tabela 6.5, para o reactor HAc:HPr 1:1, como seria de esperar, houve aumento da densidade de microrganismos. Para o reactor HAc:HPr 2:1, verifica-se também o aumento dos ciliados, embora não de forma tão acentuada. Para este reactor houve no entanto uma diminuição significativa dos flagelados que pode estar associada à existência de grande número de bactérias filamentosas. Como estas bactérias se alimentam de matéria orgânica solúvel, um “boom” de filamentosas faz escassear o alimento para as bactérias livres presentes no licor misto, alimento dos flagelados. Esta situação combinada com o facto de sofrerem competição por parte dos ciliados bacteriófagos e predação por parte de ciliados, pode ter feito com que os flagelados reduzissem bastante em número.

Analisando as bactérias filamentosas, para o dia de operação 82, obtivemos os resultados presentes na Figura 6.8. De acordo com estes dados verificou-se que o reactor HAc:HPr 1:1 iniciou a operação na ausência de filamentosas, enquanto que, o reactor HAc:HPr 2:1 pela primeira vez apresentou filamentosas com alguma abundância, valor numérico 2.

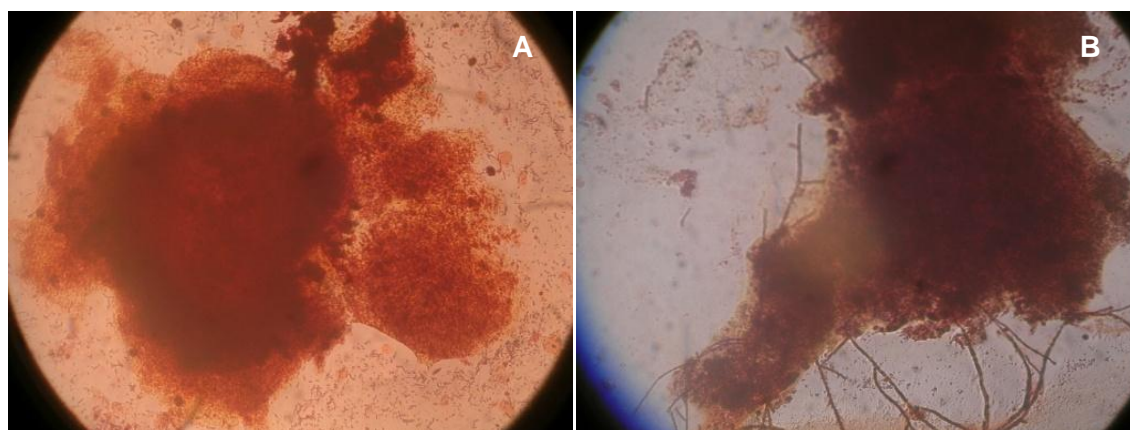


Figura 6.8 – Visualização de bactérias filamentosas no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga 8 gCQO.L^{-1} , dia de operação 82, ampliação 100x.

Analisando as bactérias filamentosas verifica-se que houve um aumento substancial destas no licor misto, apresentando-se agora, no dia 98 de operação, o reactor HAc:HPr 1:1 com uma quantidade abundante de filamentosas, valor numérico 5, e o reactor HAc:HPr 2:1 com uma quantidade de filamentosas excessiva, valor numérico 6, Figura 6.9 (A e B). A proliferação das bactérias filamentosas ocorre porque estas possuem maiores velocidades de crescimento para baixas concentrações de substrato do que as não filamentosas e requerem menor energia de manutenção, sendo desta forma favorecido o seu crescimento (PARSEKIAN *et al.*, 2002).

Para estas condições, e de acordo com os resultados dos testes de coloração de polímeros, não fazia sentido controlar um ciclo de operação com a monitorização de CQO, AOV's e pH, uma vez que o objectivo do trabalho é a selecção de bactérias com elevada capacidade de acumulação de PHAs. A quantidade de filamentosas existentes nos reactores iria levar à falência do processo.

As bactérias filamentosas existentes nos reactores não eram acumuladoras de polímeros, como iremos verificar no ponto 6.2.2 desta tese, não existindo, na literatura, relatos da existência de bactérias filamentosas acumuladoras de PHAs para culturas bacterianas obtidas através do processo utilizado nesta tese.

Como medidas de controlo de *bulking* filamentosos podemos enumerar o uso de coagulantes como sulfato ferroso, cloreto férrico e produtos precipitantes baseados em alumínio, a aplicação de tensioactivos, adição de cloro, utilização de decantadores em série, controlo da temperatura, da carga das lamas e diminuição da idade das lamas (PARSEKIAN *et al.*, 2002). Estas seriam algumas medidas que poderiam ter sido tomadas para resolver o problema do *bulking* filamentosos, mas, para determinar qual a medida de controlo adequada teria sido necessária a identificação das bactérias filamentosas, uma vez que a origem deste problema difere segundo a espécie de bactéria filamentosa presente, Tabela 4.3. Este passo não foi efectuado uma vez que nos encontrávamos na fase final do trabalho laboratorial para a elaboração desta tese.

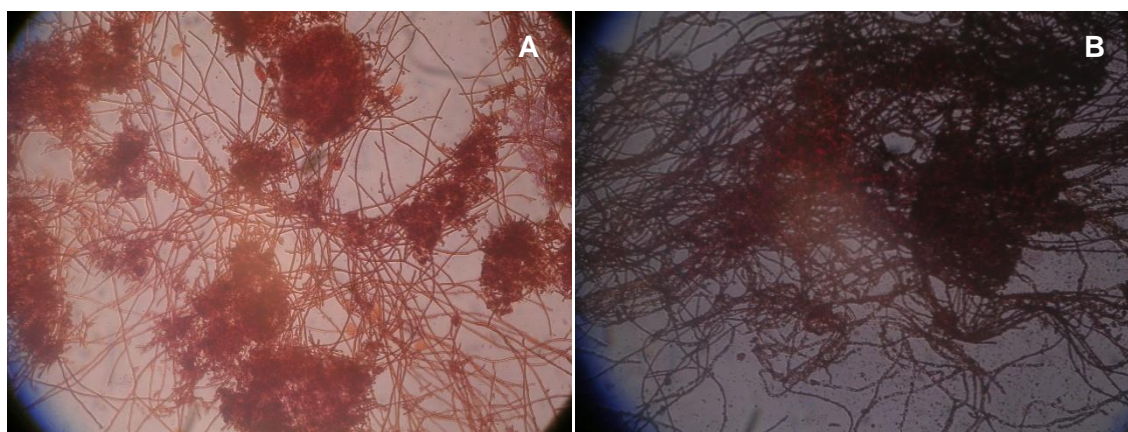


Figura 6.9 – Visualização de bactérias filamentosas no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga 8 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, dia de operação 98, ampliação 100x.

Pela análise das SPE verificamos que deram negativo para ambos os reactores, figura 6.10, no dia de operação 82 e também no dia de operação 98, Figura 6.11.

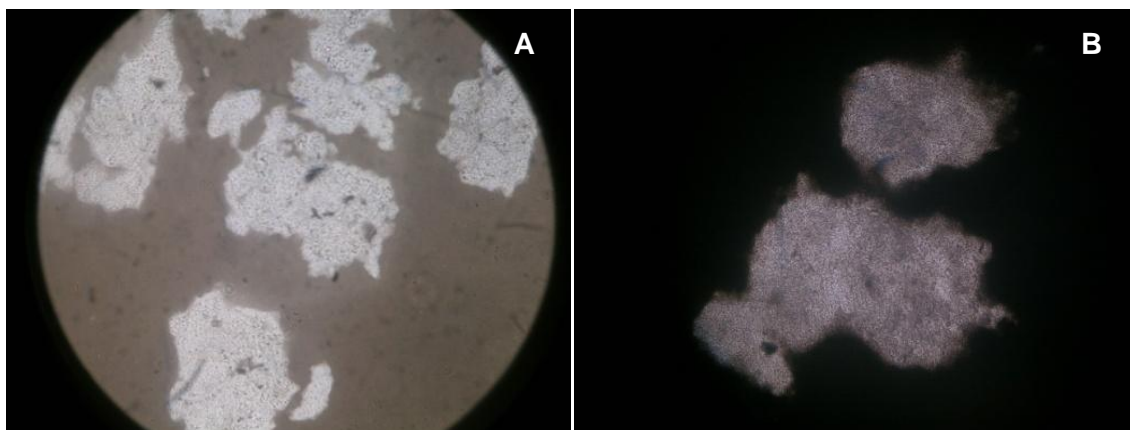


Figura 6.10 – Teste de SPE no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga 8 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, dia de operação 82, ampliação 100x.

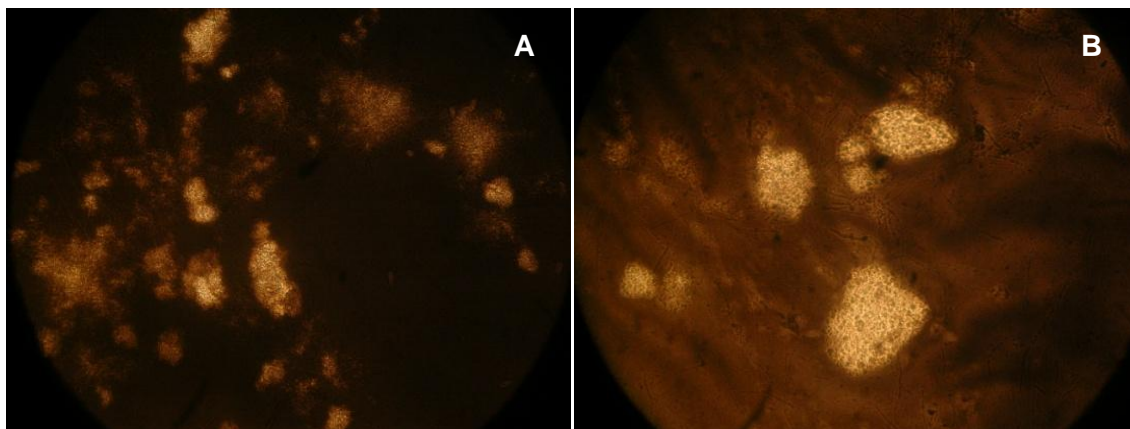


Figura 6.11 – Teste de SPE no reactor HAc:HPr 1:1 e HAc:HPr 2:1 (A e B, respectivamente), carga 8 gCQO.L⁻¹.d⁻¹, dia de operação 98, ampliação 100x.

6.2.2 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE POLÍMEROS

A verificação da acumulação de polímeros foi efectuada recorrendo a dois testes: Negro de Sudão e Azul do Nilo.

i. Método do Negro de Sudão

Para a análise de PHAs utilizando Negro de Sudão como corante, foi retirada também uma amostra de cada ciclo por cada reactor e para cada carga para posterior visualização microscópica.

Nesta parte do trabalho laboratorial, obtive alguns problemas a nível de captação de imagens, não conseguindo de forma alguma focar e obter uma imagem clara. Desta forma vou exemplificar com a melhor imagem que consegui captar (reactor HAc:HPr 2:1 e carga 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹) e para os restantes reactores vou descrever os resultados que obtive através da visualização microscópica.

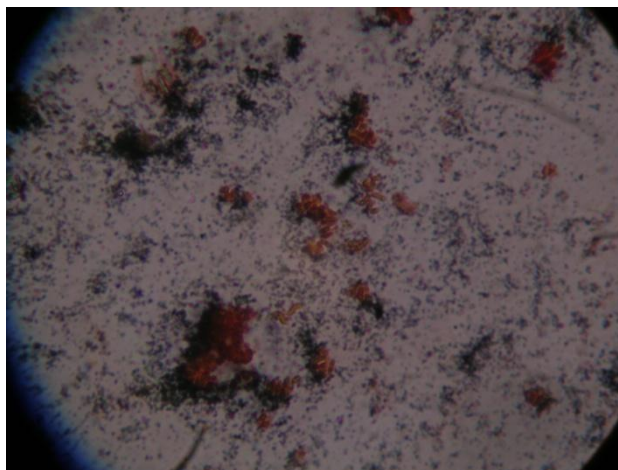


Figura 6.12 - Grânulos de PHAs com coloração de Negro de Sudão 2h após o início do ciclo para a carga 4g CQO.L^{-1} no reactor HAc:HPr 2:1, ampliação 1000x.

Analisando a Figura 6.12, verifica-se a existência de polímeros, pequenos grânulos de coloração mais escura referentes ao reactor HAc:HPr 2:1 e carga $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Este teste deu positivo para a totalidade das amostras, embora analisando a quantidade, verificou-se que a carga de $8\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ possuía muito poucos polímeros, quase inexistentes. Verificou-se assim que o aumento da carga influenciou a quantidade de polímeros visualizados. Para além disso, é preciso ter em conta que o aumento da carga também aumentou o número de bactérias presentes no licor misto, pelo que passaram a existir mais bactérias capazes de armazenar polímeros. A carga orgânica que levou a uma maior quantidade de polímeros foi a carga $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ no reactor HAc:HPr 2:1.

ii. Método do Azul do Nilo

Para a análise de polímeros recorrendo ao Azul do Nilo foram guardadas duas amostras durante a operação dos ciclos para cada carga 2, 4 e $8\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para o início e fim da fase de “fartura”.

Através da análise por microscopia de epifluorescência efectuada em Lisboa, foram obtidos os seguintes resultados:

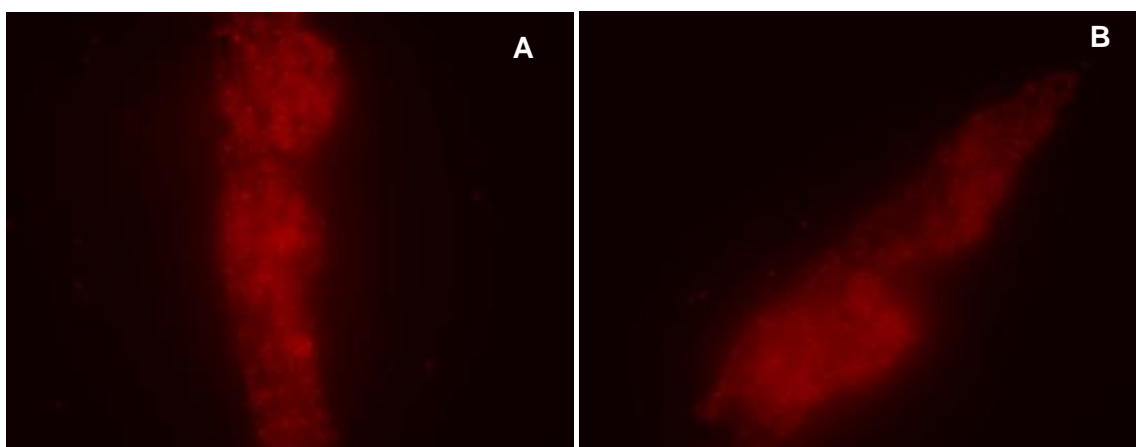


Figura 6.13 - Grânulos de PHAs com coloração de Azul do Nilo 2h após o início do ciclo para a carga $2\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ no reactor HAc:HPr 2:1 (A e B).

Foi verificada fluorescência em praticamente toda a biomassa para a carga $2\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ no reactor HAc:HPr 2:1, Figura 6.13, no início da fase de “fome”, quando todo o substrato estava armazenado como reserva intracelular. Como seria de esperar a análise efectuada para o tempo 0h, início da fase de fartura, não revelou fluorescência. Isto porque de acordo com o mecanismo de “fome” e “fartura”, o armazenamento dos PHAs durante a fase de “fartura” como fonte de energia e carbono, é utilizado durante a fase de “fome” para o crescimento celular.

Para a carga de $4\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, no reactor HAc:HPr 2:1, não foi observada fluorescência para o tempo 0h, mas para o tempo 4h, foi observada uma fluorescência muito elevada, porém devido à compactação das células não foi possível tirar fotografias.

Para a carga de $8\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, não houve verificação de fluorescência possivelmente devido à grande quantidade de bactérias filamentosas existentes nos reactores.

6.2.3 ANÁLISE GLOBAL

Analizando o processo global no que diz respeito à microbiologia verifica-se que ambos os reactores possuíram um desempenho mediano, segundo Madoni, 1994 por apresentar elevado número de flagelados e ciliados nadadores livres. Segundo este autor, os flagelados e os ciliados nadadores livres só estão presentes durante a fase de colonização sendo posteriormente substituídos por formas sésseis e móveis de fundo. A predominância destas espécies, segundo Jenkins *et al.*, 2004, é indicadora da produção de grandes quantidades de bactérias dispersas no licor misto, uma vez que são a base da sua alimentação.

Conclui-se assim que a população microbiológica existente nos reactores durante toda a fase experimental não era considerada madura, reflectindo a mudança das condições operatórias.

Ao longo do decorrer deste trabalho foram detectados alguns problemas de funcionamento, no reactor HAc:HPr 2:1, nomeadamente má sedimentabilidade das lamas no dia 13 de operação, não tendo ocorrido mais nenhum problema similar no decorrer do restante período experimental.

A diferença nas características de sedimentação no reactor HAc:HPr 1:1, para as cargas 2 e 4, foi explicada através do teste positivo que foi efectuado às SPE para as condições de operação deste reactor. As crescentes dificuldades em filtrar as amostras para análise dos SS e CQO e o aspecto gelatinoso que o reactor HAc:HPr 1:1 adquiriu por volta do dia 69 de operação, dava a entender a existência de um *bulking* viscoso. Este reactor HAc:HPr 1:1 acabou por ser novamente re-inoculado com uma população bacteriana proveniente do reactor HAc:HPr 2:1, uma vez que não estava a seleccionar microrganismos com capacidade de armazenamento de polímeros.

O reactor HAc:HPr 2:1 teve um comportamento uniforme sem problemas de filamentosas ou de SPE até à carga $8\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, contrariamente ao reactor HAc:HPr 1:1. A alteração para a carga de $8\text{gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, reflectiu-se em problemas de crescimento elevado de filamentosas nos dois reactores. Para saber qual a causa deste “boom” de

filamentosas seria necessário efectuar a identificação destas, uma vez que cada espécie de bactéria filamentosa pode caracterizar problemas específicos de funcionamento dos reactores.

Pela análise da evolução microbiológica e pelo comportamento dos reactores pode-se afirmar, à semelhança do que foi concluído na análise físico-química do funcionamento dos reactores, ponto 5.2.2 desta tese, que o reactor com melhor funcionamento foi o reactor HAc:HPr 2:1.

Para verificar se o objectivo final deste trabalho tinha sido alcançado (acumulação de biopolímeros nas células) foram efectuados dois testes de coloração: Negro de Sudão e Azul do Nilo. Pelos resultados obtidos e pela literatura, verificou-se que a coloração de Azul do Nilo possui maior especificidade para a coloração dos grânulos de PHAs, pelo que se considerou que os resultados deste teste eram mais fidedignos que os resultados obtidos com o teste da coloração Negro de Sudão.

De acordo com os resultados obtidos com a coloração Azul do Nilo e com a monitorização microbiológica efectuada aos reactores estamos em condições de afirmar que o aumento da carga de 2 para 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ no reactor HAc:HPr 2:1 fez com que houvesse maior produção de bactérias acumuladoras de PHAs.

Desta forma, de acordo com o objectivo da tese, a selecção de culturas com elevada produção de PHAs foi conseguida para o reactor HAc:HPr 2:1, para as cargas de 2 e 4 gCQO.L⁻¹.d⁻¹. Apesar de neste reactor ainda não se terem desenvolvido os microrganismos de uma população madura.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese teve como objectivo principal a selecção de bactérias com elevada capacidade de acumulação de PHAs. Como ponto de partida foi efectuada a monitorização das condições microbiológicas de operação de reactores SBR nos quais se efectuava a selecção partindo de uma cultura mista proveniente de uma estação de tratamento de efluentes domésticos. Em paralelo à monitorização microbiológica houve igualmente uma componente prática de operação dos reactores, sendo também relevante efectuar a análise de parâmetros físico-químicos para verificação da evolução do comportamento dos reactores.

Concretamente, foram operados dois reactores SBR com ciclos de 12h, tendo sido estudada a influência de duas proporções de substrato (ácido acético e ácido propiónico, 1:1 e 2:1) e da variação da carga orgânica aplicada, na selecção de bactérias acumuladoras de PHAs.

Como principais conclusões, obtidas com o desenvolvimento deste trabalho, podemos destacar:

- A análise aos protozoários permitiu concluir que a população existente durante o período experimental não era madura, o que reflecte a operação do sistema, uma vez que estando constantemente a alterar condições os microrganismos encontravam-se em constante adaptação ao meio.
- Os testes escolhidos para efectuar o controlo microbiológico foram úteis para identificar e prever casos de má sedimentabilidade dos flocos biológicos, *bulking* viscoso e *bulking* filamentoso. Desta forma foi possível decidir sobre as acções que poderiam levar à melhor solução para controlar o problema ou, em conjunto com a análise aos parâmetros físico-químicos, verificar se era relevante actuar sobre as condições operatórias dos reactores.
- No reactor HAc:HPr 1:1 foram identificados problemas de flutuação de lamas, tendo sido resolvido com a retirada das lamas que se encontravam à superfície. Foi também verificado o desenvolvimento de *bulking* viscoso, através de análises às SPE, não tendo sido tomada nenhuma medida correctiva uma vez que este reactor não estava a seleccionar bactérias acumuladoras de PHAs.
- Em ambos os reactores e para a carga de $8 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, foram identificados problemas de *bulking* filamentoso, através da visualização microscópica. Para efectuar medidas correctivas para este problema era necessário identificar o tipo de bactérias filamentosas presentes, uma vez que cada espécie tem uma causa específica associada.
- Através da análise aos AOVs verificamos que nem todo o CQO residual provém dos ácidos alimentados não degradados. A hipótese de a amónia estar a contribuir como fonte de carbono, também não se verificou. Seria necessário testar mais hipóteses para identificar a proveniência do restante CQO residual.

- Quanto ao pH verificamos que o reactor estava fora da gama óptima para operação do sistema, podendo reflectir-se em inibição da actividade da biomassa.
- Com o aumento da carga, para o reactor HAc:HPr 1:1, foram obtidos valores de taxa específica de crescimento superiores aos verificados para o reactor HAc:HPr 2:1. Em conjunto, a razão da extensão entre a fase de fartura e todo o ciclo de operação foi superior a 0,25 indicando que não existiriam condições para estarem a ser seleccionadas as bactérias acumuladoras de polímeros. Assim, para este reactor o aumento da carga não favoreceu a selecção de bactérias acumuladoras de PHAs. Este facto veio a comprovar-se através da análise microscópica de identificação de PHAs.
- Para o reactor de proporção HAc:HPr 2:1, o aumento da carga não influenciou a capacidade de remoção de substrato do meio. De facto, este foi o reactor considerado como de melhor performance tanto em termos de parâmetros físico-químicos como microbiológicos. Isto significa que o aumento da carga para este reactor continuou a favorecer a selecção de bactérias com capacidade de acumulação de polímeros, bem como uma maior produção destas bactérias.
- Para as duas proporções de substrato verificámos que o reactor de proporção HAc:HPr 2:1 teve melhor funcionamento, adaptando-se melhor às variações de carga. Como possui maior quantidade de ácido acético, do que o reactor HAc:HPr 1:1, sendo este mais facilmente assimilado que o ácido propiónico, podemos dizer que uma maior quantidade de ácido acético favoreceu um melhor funcionamento do reactor.
- A análise de PHAs com Negro de Sudão e Azul do Nilo, permitiu chegar à conclusão que o Azul do Nilo, sendo um corante de maior especificidade para os grânulos de PHAs, é o mais indicado para a verificação da existência de polímeros. O Negro de Sudão pode ser usado para uma análise prévia da existência destes polímeros, mas a sua existência terá de ser confirmada posteriormente com o corante Azul do Nilo, uma vez que como cora também substâncias lipofílicas pode traduzir-se em resultados falso-positivos para a existência de polímeros.
- Analisando os resultados obtidos com o teste Azul do Nilo, verificou-se a acumulação de PHAs para o reactor HAc:HPr 2:1. A maior acumulação deu-se para a carga $4 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ seguida da carga de $2 \text{ gCQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Podemos dizer que o objectivo principal desta tese foi atingido, porém é necessário efectuar mais estudos de forma a tornar rentável a produção de biopolímeros a partir de culturas mistas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como sugestão para trabalhos futuros pode-se referir:

- Algumas alterações experimentais como efectuar as análises de controlo de ciclo menos espaçadas na fase de fartura (intervalos de tempo inferiores a 1h) e efectuar a alimentação num intervalo de tempo mais curto, em um único instante.
- Efectuar controlo do pH do reactor ou diminuir o pH da alimentação para que o pH dentro do reactor diminua para valores abaixo de 9.
- A continuação do estudo para a proporção de substratos ácido acético, ácido propiónico 2:1, mas para cargas superiores a 8 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ uma vez que se obtiveram resultados bastante satisfatórios.
- Efectuar uma análise microbiológica quantitativa em vez de qualitativa da operação dos reactores.

O futuro da investigação com culturas mistas para produção de polímeros passa pela identificação do tipo de bactérias e quantificação de polímeros armazenados por cada uma delas, para que, através de manipulações de factores físicos, tipo de substrato ou limitação de nutrientes, se possa passar a obter, por selecção de culturas, as bactérias melhor adaptadas a determinadas condições específicas. Esta é uma área ainda muito pouco estudada, para culturas mistas, e que pode trazer avanços a nível da optimização da produção de polímeros.

CAPÍTULO 9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

(APHA), AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington: American Water Works Association and Water Environment Federation, 1998.

ABOU-ZEID, DUNJA-MANAL; MÜLLER, ROLF-JOACHIM; DECKWER, WOLF-DIETER - Degradation of natural and synthetic polyesters under anaerobic conditions. Journal of Biotechnology. Vol. 86, n.º 2 (2001), p. 113-126.

ALBUQUERQUE, M. [et al.] - Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. Journal of Biotechnology. Vol. 130, n.º 4 (2007), p. 411-421.

ALBUQUERQUE, M. G. E.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. - Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. Water Research. Vol. 44, n.º 11 (2010), p. 3419-3433.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; KH, SCHLEIFER - Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation Microbiological Reviews. Vol. 59, n.º 1 (1995), p. 143-169.

AMANN, R. [et al.] - In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. Journal of bacteriology. Vol. 178, n.º 12 (1996), p. 3496-500.

AMBIENTE, AGÊNCIA PORTUGUESA DO - Relatório do Estado do Ambiente 2008. Amadora: 2009.

ANNACHHATRE, A. P. - Anaerobic treatment of industrial wastewaters. Resources, Conservation and Recycling. Vol. 16, n.º 1-4 (1996), p. 161-166.

B.C.COUTINHO [et al.] - A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (Plástico biodegradável). (2004), p. 76-81.

BECCARI, M [et al.] - A bulking sludge with high storage response selected under intermittent feeding. Water Research. Vol. 32, n.º 11 (1998), p. 3403 - 3413.

BEDGONI, G.; FALANELLI, A.; PEDRAZZI, R. - Evaluation of the abundance ratio between crawling and attached ciliates in the management of an activated sludge sewage treatment plant. . In: MADONI, P. - Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives. 1991.

BENGTTSSON, SIMON [et al.] - Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. Biochemical Engineering Journal. Vol. 40, n.º 3 (2008), p. 492-499.

BHATTACHARYYA, J. K.; KUMAR, SUNIL; DEVOTTA, SUKUMAR - Studies on acidification in two-phase biomethanation process of municipal solid waste. Waste Management. Vol. 28, n.º 1 (2008), p. 164-169.

BYROM, D - Polymer synthesis by microorganisms; technology and economics. Trends in Biotechnology. n.º 5 (1987), p. 246-250.

CANLER, JEAN PIERRE [et al.] - Aide au diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des boues activées. Editions Quae, 1999.

CARMINATTI, CRISTIANE [et al.] - Produção de Polihidroxialcanoatos (PHAs). Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina - Centro Tecnológico, 2006.

CHARMOT, M.; ROCHE, N.; PROST, C. - Influence of cyclic feeding on high strength wastewater treatment by activated sludge. Rev. de L'Eau. Vol. 10, n.º 3 (1997), p. 376-394.

CHEN, GUO-QIANG - Industrial Production of PHA. In: CHEN, G. G.-Q. - Plastics from Bacteria. Springer Berlin / Heidelberg, 2010. p. 121-132.

CHINWETKITVANICH, SOPA; RANDALL, CLIFFORD W.; PANSWAD, THONGCHAI - Simultaneous COD Removal and PHA Production in an Activated Sludge System under Different Temperatures: 2009. 2009.

CHOI, JONG-IL; LEE, SANG YUP - Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. Bioprocess and Biosystems Engineering. Vol. 17, n.º 6 (1997), p. 335-342.

CHUA, A. - Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. Water Research. Vol. 37, n.º 15 (2003a), p. 3602-3611.

CHUA, ADELINE S. M. [et al.] - Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. Water Research. Vol. 37, n.º 15 (2003b), p. 3602-3611.

CHUA, H.; YU, P. H. F.; HO, L. Y. - Recovery of biodegradable polymers from food-processing wastewater activated sludge. Journal of IES. Vol. 37, n.º 2 (1997), p. 9-13.

CRUDS, C. R.; COCKBURN, A. - Protozoa as indicators in the activated-sludge process. In: RES., W. - Protozoa in biological sewage-treatment processes II. 1970. p. 237-249.

DAIMS, HOLGER; WAGNER, MICHAEL - Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 75, n.º 2 (2007), p. 237-248.

DE SMET, M J [et al.] - Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. J. Bacteriol. Vol. 154, n.º 2 (1983), p. 870-878.

DELONG, EF; WICKHAM, GS; PACE, NR - Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science. n.º 243 (1989), p. 1360-1363.

DIAS, JOÃO M. L. [et al.] - Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. Macromolecular Bioscience. Vol. 6, n.º 11 (2006), p. 885-906.

DIAS, JOAO [et al.] - Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed microbial cultures. BMC Systems Biology. Vol. 2, n.º 1 (2008), p. 59.

DIONISI, D. [et al.] - Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. Water Research. Vol. 39, n.º 10 (2005a), p. 2076-2084.

DIONISI, D. [et al.] - Effect of Feed Length on Settleability, Substrate Uptake and Storage in a Sequencing Batch Reactor Treating an Industrial Wastewater. Environmental Technology. Vol. 27, n.º 8 (2006a), p. 901 - 908.

DIONISI, D.; MAJONE, M.; RAMADORI, R. - Bulking and Foaming Control Methods. In: TANDOI, V.; JENKINS, D. ; WANNER, J. - Activated sludge separation problems: theory, control measures, practical experiences. London: IWA Publishing, 2006b.

DIONISI, DAVIDE [et al.] - Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. Vol. 80, n.º 11 (2005b), p. 1306-1318.

DIONISI, DAVIDE [et al.] - Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 85, n.º 6 (2004), p. 569-579.

DIONISI, DAVIDE [et al.] - Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 93, n.º 1 (2006c), p. 76-88.

FIGUEIREDO, G. M.; DOMINGUES, V. B. - Microbiologia de lodos activados. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. (1997), p. 48.

FORMOLO, C. M. [et al.] - Poliídrolxalcanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. Revista Saúde e Ambiente. Vol. 4, n.º 2 (2003).

FUENTES, MAUREN [et al.] - Application of two anaerobic digestion models to biofilm systems. Biochemical Engineering Journal. Vol. 38, n.º 2 (2008), p. 259-269.

GERARDI, MICHAEL H. - Wastewater bacteria. New Jersey: Wiley- Interscience, 2006.

GNANOU, YVES; FONTANILLE, MICHEL- Organic and Physical Chemistry of Polymers. USA: John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2008.

HU, LINLIN [et al.] - Study on performance characteristics of SBR under limited dissolved oxygen. Process Biochemistry. Vol. 40, n.º 1 (2005), p. 293-296.

JACQUEL, NICOLAS [et al.] - Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). Biochemical Engineering Journal. Vol. 39, n.º 1 (2008), p. 15-27.

JENDROSSEK, D [et al.] - Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system. J. Bacteriol. Vol. 177, n.º 3 (1995), p. 596-607.

JENKINS, DAVID; RICHARD, MICHAEL G.; DAIGGER, GLEN T. - Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems. IWA Publishing, 2004.

JOBAGY, A.; TARDY, G. - Implementation of glycogen accumulating bacteria in treating nutrient-deficient wastewater. Water Sci Technol. Vol. 46 (2002), p. 1-2.

JOHNSON, KATJA [et al.] - Enrichment of a Mixed Bacterial Culture with a High Polyhydroxyalkanoate Storage Capacity. Biomacromolecules. Vol. 10, n.º 4 (2009), p. 670-676.

KATZ, DAVID A. - Polymers. Chemist, Science Communicator, and Consultant. (1998).

KESHAVERZ, TAJALLI; ROY, IPSITA - Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. Current Opinion in Microbiology. Vol. 13, n.º 3 (2010), p. 321-326.

KHANNA, SHILPI; SRIVASTAVA, ASHOK K. - Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochemistry. Vol. 40, n.º 2 (2005), p. 607-619.

KITA, KEIKO [et al.] - Cloning of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122, and characterization of its gene product. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression. Vol. 1352, n.º 1 (1997), p. 113-122.

KNOLL, MICHAEL [et al.] - The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. BMC Bioinformatics. Vol. 10, n.º 1 (2009), p. 89.

KRISHNA, CHUNDAKKADU; VAN LOOSDRECHT, MARK C. M. - Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. Water Research. Vol. 33, n.º 10 (1999), p. 2374-2382.

LAGEVEEN, ROLAND G. [et al.] - Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 54, n.º 12 (1988), p. 2924-2932.

LEE, S Y; CHANG, H N - Production of poly(hydroxyalkanoic acid). Rev. Biotechnol., n.º 52 (1995), p. 28-57.

LEE, S. Y. - Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 49, n.º 1 (1996a), p. 1-14.

LEE, SANG YUP - Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Vol. 14, n.º 11 (1996b), p. 431-438.

LEE, SANG YUP; CHOI, JONG-IL; WONG, HENG HO - Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 25, n.º 1-3 (1999), p. 31-36.

LEMOES, P.; SERAFIM, L.; REIS, M. - Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. Journal of Biotechnology. Vol. 122, n.º 2 (2006), p. 226-238.

LIU, HONG; FANG, HERBERT H. P. - Characterization of Electrostatic Binding. Sites of Extracellular Polymers by Linear. Programming Analysis of Titration Data. Wiley Periodicals, Inc. (2002).

LUZIER, WILLIAM D. - Materials derived from biomass/ biodegradable materials. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 89 (1992), p. 839-842.

MADONI, PAOLO - Protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency. In: MARA, D. ; HORAN, N. - Handbook of water and wastewater microbiology. Academic Press, 2003. p. 819.

MADONI, PAOLO - A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. Water Research. Vol. 28, n.º 1 (1994), p. 67-75.

MADONI, PAOLO; ANTONIETTI, R. - Colonization dynamics of ciliated protozoa population in an activated sludge plant. Proceeding IV Ital. Symp. Popul. Dynam. (1984), p. 105-112.

MAJONE, M.; DIRCKS, K.; BEUN, J. J. - Aerobic storage under dynamic conditions in activated sludge processes. The state of the art. Water Science and Technology. Vol. 39, n.º 1 (1999), p. 61-73.

MARCO, N. DE [et al.] - Performance of biological sewage treatment plants: some experiences on municipal plants in the province of Pordinone. In: MADONI, P. - Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives. 1991.

MCCARTY, PERRY L.; SMITH, DANIEL P. - Anaerobic wastewater treatment. Environmental Science & Technology. Vol. 20, n.º 12 (1986), p. 1200-1206.

MCCARTY PL - Anaerobic waste treatment fundamentals III. Public Works. Vol. 95 (1964), p. 91-94.

MCINERNEY, M. J. - Anaerobic Metabolism and its Regulation: Biotechnology Set. Wiley-VCH Verlag GmbH, 1999.

MCSWAIN, B. S. [et al.] - Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 71, n.º 2 (2005), p. 1051-1057.

MEESTERS, K. - Production of poly-3-hydroxyalkanoates from waste streams. Design Report, Delft University of Technology, 1998.

OJUMU, T.V.; YU, J.; SOLOMON, B. O. - Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. African Journal of Biotechnology. Vol. 3, n.º January (2004), p. 18-24.

OSTLE, A G; HOLT, J G - Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 44, n.º 1 (1982), p. 238-241.

PAGNOTTA, R.; TOMMASI, M. - Applicazione di parametric biologici allo studio del fenomeno del bulking. Inquinamento. n.º 21 (1979), p. 27-32.

PARSEKIAN, MARILU PEREIRA SERAFIM; PIRES, EDUARDO CLETO- Monitoramento e controle do crescimento excessivo de bactérias filamentosas em sistema anaeróbio/aeróbio de tratamento de esgoto doméstico: XXVIII Congresso Interamericano de Ingenieria Sanitaria y Ambiental. Cancún, México, 2002.

PIRRA, ANTÓNIO JOSÉ DUQUE - Caracterização e tratamento de efluentes vinícolas da região demarcada do Douro. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2005. 326 f.

PLASTICSEUROPE [et al.] - The Compelling Facts About Plastics 2009, An analysis of European plastic production, demand and recovery for 2008. Bruxelas: European Plastic Industry, 2009.

PRADELLA, JOSÉ GERALDO DA CRUZ - Biopolímeros e Intermediários Químicos. São Paulo: Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP, 2006.

REDDY, C. S. K. [et al.] - Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource Technology. Vol. 87, n.º 2 (2003), p. 137-146.

REIS, M. A. M. [et al.] - Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. Bioprocess and Biosystems Engineering. Vol. 25, n.º 6 (2003), p. 377-385.

RICHARD, MICHAEL- Activated sludge microbiology problems and their control: Presented at the 20 th Annual USEPA National Operator Trainers Conference Buffalo, New York, 2003.

ROMEN, FABIAN; REINHARDT, SIMONE; JENDROSSEK, DIETER - Thermotolerant poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacteria from hot compost and characterization of the PHB depolymerase of Schlegelella sp. Archives of Microbiology. Vol. 182, n.º 2 (2004), p. 157-164.

ROSA, DERVAL S.; FRANCO, BRUNO L. M; CALIL, MARIA REGINA - Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. Polímeros: Ciência e Tecnologia. Vol. 11, n.º 2 (2001), p. 82-88.

ROSA, DERVAL S. [et al.] - Avaliação da Biodegradação de Poli- β - (Hidroxibutirato), Poli- β - (Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- ϵ - (caprolactona) em Solo Compostado. Polímeros: Ciência e Tecnologia. Vol. 12, n.º 4 (2002), p. 311-317.

SALEHIZADEH; H. - Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. Biotechnology Advances. Vol. 22, n.º 3 (2004), p. 261-279.

SANTOS, RUI; MARTINS, JOÃO GUERRA- Materiais de Construção, Plásticos: Materiais. 1ª. 2004.

SATOH, H [et al.] - Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. Water Science and Technology. Vol. 38, n.º 2 (1998), p. 103 - 109.

SCOTT, GERALD - 'Green' polymers. Polymer Degradation and Stability. Vol. 68, n.º 1 (2000), p. 1-7.

SERAFIM, LUISA S. [et al.] - Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 81, n.º 4 (2008a), p. 615-628.

SERAFIM, LUÍSA S. [et al.] - Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 87, n.º 2 (2004), p. 145-160.

SERAFIM, LUÍSA S.; LEMOS, PAULO C.; REIS, MARIA A. M. - Produção de Bioplásticos por Culturas Microbianas Mistas. Boletim de Biotecnologia. (2000).

SERAFIM, LUÍSA S. [et al.] - The Influence of Process Parameters on the Characteristics of Polyhydroxyalkanoates Produced by Mixed Cultures. Macromolecular Bioscience. Vol. 8, n.º 4 (2008b), p. 355-366.

SEVIOUR, ROBERT J.; NIELSEN, PER H. - Microbial communities in activated sludge plants. In: SEVIOUR, R. J. - Microbial Ecology of Activated Sludge. London: IWA Publishing, 2010. p. 643.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. - Stability of sludge flocs under shear conditions: Roles of extracellular polymeric substances (EPS). Biotechnology and Bioengineering. Vol. 93, n.º 6 (2006), p. 1095-1102.

SHIROKITAMURA; DOI, YOSHIHARU - Staining method of poly(3-hydroxyalkanoic acids) producing bacteria by Nile Blue. Biotechnology Techniques. Vol. 8 (1994), p. 345-350.

SOBRINHO, MAURÍCIO A. DA MOTTA [et al.] - Utilização do Processamento Digital de Imagens no Monitoramento de Estações de Tratamento de Efluentes SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. Recife, 2005.

SU, KUI-ZU; YU, HAN-QING - Formation and Characterization of Aerobic Granules in a Sequencing Batch Reactor Treating Soybean-Processing Wastewater. Environmental Science & Technology. Vol. 39, n.º 8 (2005), p. 2818-2827.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. - Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Progress in Polymer Science. Vol. 25, n.º 10 (2000), p. 1503-1555.

TCHOBANOGLIOUS, GEORGE; BURTON, FRANKLIN LOUIS; STENSEL, H. DAVID - Wastewater Engineering: treatment disposal and reuse. Third. McGraw-Hill International Edition, 2003.

THIRD, K. A.; NEWLAND, M.; CORD-RUWISCH, R. - The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures. Biotechnology and Bioengineering. ISSN 1097-0290. Vol. 82, n.º 2 (2003), p. 238-250.

THOMAZ, S. M. - Perspectivas da limnologia no Brasil. In: O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos. São Luís: União, 1999. p. 198.

VAVILIN, V. A. [et al.] - Modelling methanogenesis during anaerobic conversion of complex organic matter at low temperatures. Water Science and Technology. Vol. 36, n.º 6-7 (1997), p. 531-538.

VAVILIN, V. A.; RYTOV, S. V.; LOKSHINA, L. YA - A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. Bioresource Technology. Vol. 56, n.º 2-3 (1996), p. 229-237.

VAVILIN, V. A.; RYTOW, S. V.; LOKSHINA, L. YA - Modelling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria. Bioresource Technology. Vol. 54, n.º 2 (1995), p. 171-177.

VILLANO, MARIANNA [et al.] - Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. Process Biochemistry. Vol. 45, n.º 5 (2010), p. 714-723.

WALLEN, LOWELL L.; ROHWEDDER, WILLIAM K. - Poly-.beta.-hydroxyalkanoate from activated sludge. Environmental Science & Technology. Vol. 8, n.º 6 (1974), p. 576-579.

WANG, F; LEE, SY - Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 63, n.º 9 (1997), p. 3703-3706.

WANG, Y. J. [et al.] - Synthesis of PHAs from waster under various C:N ratios. Bioresource Technology. Vol. 98, n.º 8 (2007), p. 1690-1693.

WEN, QINXUE [et al.] - Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. Journal of Environmental Sciences. Vol. 22, n.º 10 (2010), p. 1602-1607.

WINGENDER, JOST; NEU, THOMAS R.; FLEMMING, HANS-CURT - Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. Berlin: Springer, 1999.

YAMANE, T; FUKUNAGA, M; LEE, Y W - Increaser PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. Biotechnol Bioeng. n.º 50 (1996), p. 197-202.

YAN, S. [et al.] - Sustainable Sludge Management Wastewater Sludge Characteristics. United States of America: ASCE
EWRI, 2009.

ZOETEMEYER, R. J.; VAN DEN HEUVEL, J. C.; COHEN, A. - pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester. Water Research. Vol. 16, n.º 3 (1982), p. 303-311.

ANEXOS

Anexo A - Função dos vários elementos constituintes da alimentação fornecida aos SBRs.

Elemento	Função
Sódio	Activador enzimático; transporte através das membranas; manutenção da integridade da célula; facilita o crescimento;
Potássio	Cofactor para enzimas; manutenção do balanço osmótico
Ferro	Componente dos citocromos de enzimas que contêm grupo heme e efectuam o transporte de electrões e proteínas; Fonte de energia
Magnésio	Activador enzimático, particularmente para reacções de quinases
Cálcio	Activador enzimático, particularmente para quinases de proteínas; <i>componente do ácido dipicolínico nos endosporos bacterianos</i>
Manganésio	Activador enzimático, particularmente para enzimas que fazem a transferência de grupos fosfatos
Molibdénio	Activador enzimático para fixação do azoto

Índice Biológico de Lamas

Anexo B – Identificação do IBL baseado nos grupos dominantes, densidade e número de unidades taxonómicas (MADONI, 1994).

Grupo dominante e densidade total da microfauna		Número total de unidades taxonómicas que constituem a microfauna das lamas activadas e número de pequenos flagelados (F)							
Grupo dominante ou prevalente	Dens. (ind./L)	>10		8-10		5-7		<5	
		F<10	10<F<100	F<10	10<F<100	F<10	10<F<100	F<10	10<F<100
Ciliados móveis + sésseis* e/ou ameba com teca	$\geq 10^6$	10	8	9	7	8	6	7	5
	$< 10^6$	9	7	8	6	7	5	6	5
Ciliados sésseis* >80%	$\geq 10^6$	9	7	8	6	7	5	6	4
	$< 10^6$	8	6	7	5	6	4	5	4
Operculária spp.	$\geq 10^6$	7	5	6	4	5	3	4	3
	$< 10^6$	6	4	5	3	4	2	3	2
Vorticella microstoma	$\geq 10^6$	6	4	5	3	4	2	3	1
	$< 10^6$	5	3	4	2	3	1	2	1
Ciliados nadadores	$\geq 10^6$	5	3	4	2	3	1	2	0
	$< 10^6$	4	2	3	1	2	0	1	0
Pequenos flagelados (>100)Y	$\geq 10^6$	4		3		2		1	
	$< 10^6$	3		2		1		0	

Operculária e Vorticella microstoma não abundante

Y – n.º de flagelados na diagonal da câmara de Fuchs- Rosenthal

Anexo C – Conversão do IBL em 4 classes de qualidade e respectivas características do sistema (MADONI, 1994).

Valores IBL	Classe	Características
8 - 10	I	Sistema muito bem colonizado com excelente actividade biológica e elevada eficiência depuradora
6 - 7	II	Lamas estáveis e bem colonizadas, actividade biológica em declínio e eficiência de depuração suficiente
4 - 5	III	Actividade biológica insuficiente e insuficiente depuração biológica
0 - 3	IV	Actividade biológica muito baixa e fraca depuração biológica

121

